

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Шлеева Маргарита Олеговна
ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ
ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

03.01.04 Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор Капрельянц А.С.

МОСКВА 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	22
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	22
1.1. Покоящиеся формы бактерий	22
1.2. «Некультивируемость» как частный случай покоя.	27
1.3. Покой, персистенция и латентность: сходство и различия на примере возбудителя туберкулеза <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
1.4. Адаптивные механизмы выживания <i>M. tuberculosis</i> внутри макрофага хозяина при первичном заражении.	39
1.5. Моделирование нерепликативного состояния <i>Mycobacterium tuberculosis in vitro</i>	44
1.6. Особенности биохимии возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния в условиях стресса.	53
1.6.1. Регуляция транскрипции генов.	53
1.6.2. Особенности протеомного профиля микобактерий в моделях нерепликативного состояния <i>in vitro</i>	64
1.7. Реактивация покоящихся форм бактерий. Роль белков семейства Rpf в реактивации «некультивируемых» бактерий.	67
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	75
2.1. Микробиологические методы.....	75
2.1.1. Выращивание микроорганизмов и состав сред.	75
2.1.2. Оценка жизнеспособности клеток.	79
2.1.3. Получение супернатантов для восстановления «некультивируемых» форм.....	80
2.1.4. Оценка уровня метаболической активности.	80
2.1.5. Активность дыхательной цепи.	81
2.1.6. Оценка чувствительности к антибиотикам и повышенным температурам.....	82
2.1.7. Наиболее вероятное число клеток (НВЧК).	82
2.1.8. Реактивация «некультивируемых» форм.	83
2.1.9. Микроскопия.	84

2.1.10. Фракционирование морфологически различающихся бактериальных клеток.	85
2.1.11. Проточная цитометрия.	86
2.1.12. Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) ингибиторов Rpf.....	86
2.1.13. Определение минимальных бактерицидных концентраций (МБК) полидиаллиламинов.....	87
2.2. Биохимические методы.	89
2.2.1. Выделение и очистка рекомбинантных белков.	89
2.2.2. Определение содержания ионов аммония в клетках и культуральной жидкости.....	91
2.2.3. Электрофорез и иммуноблоттинг клеточных экстрактов, выделенных из культур <i>M. smegmatis</i>	91
2.2.4. Выделение и очистка РНК	92
2.2.5. ПЦР в реальном времени	93
2.2.6. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).....	95
2.2.7. Экстракция растворимых веществ.....	96
2.2.8. Тонкослойная хроматография	96
2.2.9. Измерение количества тиолов.	96
2.2.10. Измерение внутриклеточных концентраций NADH и NAD ⁺	97
2.2.11. Измерение количества цАМФ.	97
2.2.12. Измерение уровня АТФ	98
2.2.13. Экстракция пигмента из клеток.	98
2.2.14. Выделение пигмента из супернатанта.	98
2.2.15. Спектры поглощения и флуоресценции.	99
2.2.16. ВЭЖХ анализ трегалозы, глюкозы, порфирина.	99
2.2.17. Конфокальная микроскопия.	100
2.2.18. Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF анализ) пигмента и муропептидов.	100
2.3. Анализ протеомного профиля.	101
2.3.1. Подготовка образцов для проведения двумерного электрофореза.	101
2.3.2. Определение количества белка	102
2.3.3. Двумерный электрофорез	102

2.3.4. Анализ MALDI-TOF	104
2.4. Определение активности ферментов.	104
2.4.1. Получение грубого экстракта бактерий.	104
2.4.2. Активность трегалазы.	105
2.4.3. Активность алкогольдегидрогеназы.	105
2.4.4. Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы.	105
2.4.5. Активность глицеролкиназы.	105
2.4.6. Активность глицеральдегид -3-фосфатдегидрогеназы.	106
2.4.7. Активность фосфоглицераткиназы.	106
2.4.8. Активность пируваткиназы	106
2.4.9. Активность лактатдегидрогеназы (ферментирующей).....	107
2.4.10. Активность хинон зависимой лактатдегидрогеназы.	107
2.4.11. Активность изоцитратлиазы.	107
2.4.12. Активность НАДН оксидазы.	107
2.4.13. Муралитическая активность Rpf.	107
2.4.14. Измерения тушения флуоресценции RpfB.....	108
2.4.15. Получение пептидогликана (ПГ) и оценка ферментативной активности Rpf.	109
2.5. Молекулярно-биологические методы.	110
2.5.1. Гиперэкспрессия Rv2212 в <i>M. tuberculosis</i>	110
2.5.2. Конструирование экспрессионного вектора pES.	111
2.5.3. Конструирование экспрессионного вектора pES_MSMEG_4535.	111
2.5.4. Конструирование экспрессионного вектора pMindAЦ, гиперэкспрессирующего аденилатциклазу MSMEG_4279.	112
2.5.5. Создание мутантного штамма <i>M. smegmatis</i> с делецией гена MSMEG_4279, кодирующего аденилатциклазу.	113
2.6. Мыши и инфекция.	114
2.6.1. Заражение мышей.	114
2.6.2. Анализ КОЕ <i>ex vivo</i>	114
2.7. Фотодинамическая инаktivация микобактерий.	115
2.8. Статистика.	115
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	116

3.1. Создание моделей покоящихся форм микобактерий <i>in vitro</i> , имитирующих свойства возбудителя ТБ в период латентной формы заболевания.	116
3.1.1. Образование овоидных покоящихся клеток <i>Mycobacterium smegmatis</i>	117
3.1.2. Образование покоящихся «некультивируемых» клеток <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	128
3.1.3. Получение покоящихся форм <i>Corynebacterium jeikeium</i> на основе выявленных подходов и принципов.	136
3.1.4. Модель латентного туберкулеза <i>in vivo</i> на основе покоящихся форм микобактерий, полученных <i>in vitro</i>	139
3.2. Характеристика покоящихся клеток микобактерий.	145
3.2.1. Оценка способности покоящихся микобактерий к росту на плотных и жидких средах.	148
3.2.2. Активность метаболизма покоящихся овоидных «некультивируемых» микобактерий и их устойчивость к антибиотикам и повышенным температурам.	150
3.2.3. Характеристика запасенных веществ покоящихся микобактерий.	158
3.2.3.1. Трегалоза.	158
3.2.3.2. Порфирины.	167
3.2.3.2.1. Анализ пигмента, накапливающегося в покоящихся клетках <i>M. smegmatis</i>	167
3.2.3.2.2. Фотодинамическая инаktivация покоящихся микобактерий посредством их эндогенных порфиринов.	178
3.2.4. Особенности протеомного профиля покоящихся микобактерий. .	183
3.2.4.1. Характеристика представленности белков в активно растущих и покоящихся формах <i>M. smegmatis</i>	190
3.2.4.2. Характеристика представленности белков в активно растущих и покоящихся формах <i>M. tuberculosis</i>	193
3.2.4.3. Основные метаболические пути покоящихся форм микобактерий.	194
3.2.4.4. Сравнение протеома покоящихся ОК микобактерий, полученных при постепенном закислении внешней среды с протеомами, полученными с применением других моделей покоя микобактерий.	209
3.2.5. Микобактериальная клетка в состоянии покоя.	213
3.3. Реактивация покоящихся микобактерий.	217

3.3.1. Роль трегалозы/трегалазы в реактивации покоящихся микобактерий.	219
3.3.2. Факторы реактивации липидной природы.....	230
3.3.3. Вовлечение цАМФ в реактивацию покоящихся микобактерий. ...	237
3.3.4. Гиперэкспрессия аденилатциклазы Rv2212 и цАМФ-зависимого транскрипционного фактора Rv3676 в <i>M. tuberculosis</i> улучшает жизнеспособность бактерий, ускоряет реактивацию из покоящегося состояния и повышает вирулентность у мышей.	246
3.3.5. Связь жирных кислот, цАМФ и белков Rpf в реактивации покоящихся микобактерий.....	256
3.3.5.1. Нитрофенилтиоцианаты ингибируют ферментативную и биологическую активность белков Rpf.	257
3.3.5.2. От свободных ненасыщенных жирных кислот к белкам Rpf.	266
3.3.6. Фрагменты пептидогликана (ФПГ) стимулируют реактивацию покоящихся «некультивируемых» микобактерий.....	272
3.3.7. Синергическое действие пептидогликангидролаз RpfB и RipA в отношении гидролиза пептидогликана и реактивации «некультивируемых» микобактерий.....	283
3.3.8. Гипотетическая схема реактивации покоящихся микобактерий...	294
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	296
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	301
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	344
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Белки, выявленные методом двумерного электрофореза в экстрактах вегетативных и покоящихся форм <i>Mycobacterium smegmatis</i>	344
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Белки, выявленные методом двумерного электрофореза в экстрактах вегетативных и покоящихся форм <i>M. tuberculosis</i>	376
Благодарности	409

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – 5-аминолевулиновая кислота

ангидроГМДП – N-ацетилглюкозаминил- β (1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат

АФК – активные формы кислорода

АЦ – аденилатциклаза

БСА – бычий сывороточный альбумин

БФТ – 4-бензоил-2-нитрофенилтиоцианат

ЖК – жирные кислоты

ЖНК – жизнеспособные, но некультивируемые клетки

ИР – индекс реактивации (НВЧК/КОЕ)

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛАМ – липоарабиноманнан

ЛТБ – латентный туберкулез

МП – мембранный потенциал

МПБ (NB) – мясо-пептонный бульон (“Nutrient broth”)

МКР – метод конечных разведений

НБ – «некультивируемые» бактерии

НВЧК – наиболее вероятное число клеток

НК – нуклеиновые кислоты

НФТ – нитрофенилтиоцианаты

ОК – овоидные клетки

ОП – оптическая плотность

ОЧК – общее число клеток

ПГ – пептидогликан

ПМ – покоящиеся микобактерии

СН – супернатант, полученный центрифугированием и фильтрованием через 0.2 мкм фильтр бактериальных культур

СНЖК - свободные ненасыщенные жирные кислоты

ТА – токсин-антитоксин

ТАГ – триацилглицеролы

ТБ – туберкулез

ФДИ – фотодинамическая инаktivация

ФПГ – фрагменты пептидогликана

ФС – фотосенсибилизатор

цАМФ-ТФ – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор

ЦПК – цистоподобные покоящиеся клетки

ASB (англ. 14 - Amidosulfobetaine) – 14 -амидосульфобетанин

HdB – синтетическая среда Hartman's-de Bont

mHdB – модифицированная синтетическая среда Hartman's-de Bont

Hlp – гистоно-подобный белок (англ. histon-like protein)

Msm – *Mycobacterium smegmatis*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

OD₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600 нм

PI – propidium iodide, флуоресцентный краситель, детектирующий поврежденные клетки

Rpf – белковый фактор, способствующий реактивации ПФ бактерий
(англ. Resuscitation promoting factor)

cAMP-CRP (англ. cAMP receptor protein) – Конъюгат цАМФ с пероксидазой хрена

CHAPS (англ. 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate hydrate) 3- (3-холамидопропил) – диметиламмоний-1-пропансульфонат гидрат

ClCCP – carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (электрогенный протонофор, разобщитель дыхательной цепи)

CPM (англ. count per minute) – количество импульсов в минуту

СТС – хлорид 5-циано-2,3-дитолилтетразолия, флуоресцентный краситель, детектирующий клеточное дыхание

DCPIP (англ. dichlorophenolindophenol) – 2,6-дихлорфенолиндофенол

DTNB (англ. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) – 5,5-дитио-бис- (2-нитробензойная кислота

DTT (англ. dithiothreitol) – 1,4-дитиотретол

EDTA (англ. ethylenediaminetetraacetic acid) – этилендиаминтетрауксусная кислота

ELISA (англ. enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ

HEPES (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)

IclR (англ. isocitrate lyase regulator) – регулятор изоцитратлиазы

MOPS (англ. 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) – 3-(N-морфолино) пропансульфоновая кислота

MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

MprA – Mycobacterial persistence regulator

MTT (англ. 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил] - 2,5-дифенилтетразолия бромид

PMSF (англ. phenylmethanesulfonylfluoride) – Фенилметансульфонилфторид

RPMI (англ. Roswell Park Memorial Institute medium) – среда для культур клеток и тканей. Точный состав является коммерческой тайной.

SDS – додецилсульфат натрия (англ. sodium dodecyl sulfate)

TCEP (англ. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) – Трис-(2-карбоксиметил)-фосфин-гидроксидхлорид

TNB (англ. 5-thio-2-nitrobenzoic acid) – 5-тио-2-нитробензойная кислота

TNF(англ. tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TST (англ. tuberculin skin test) – туберкулиновая подкожная проба

VM-A (англ. validamycin)– валидамицин-А

PDAA – диаллиламмоний

PDAATFA – вторичный поли (диаллиламмонийтрифторацетат)

PDAMATFA – третичный поли (диаллилметиламмонийтрифторацетат)

ВВЕДЕНИЕ

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 истощение кислорода в культуре обуславливало массовую гибель большинства клеток микобактерий, тогда как постепенное развитие гипоксии переводило микобактерии в неделящееся 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 (Koprelyants 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 рН. Клетки *Mtb* способны адаптироваться к неблагоприятным условиям внутри макрофага, а именно, к воздействию слабокислых значений рН (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 рН 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 рН 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 этапа 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 сохранных 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 (муропептиды), 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 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 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 диагностических критериев 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 Пущинской школе-конференции молодых ученых (г. Пущино, 2014); VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2015 (Барселона, Испания, 2015); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2016», (Москва, 2016); EMBO Conference Tuberculosis 2016 (Париж, Франция, 2016); Keystone Symposia Conference (Vancouver, Canada, 2017); 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); 1-й Российский Микробиологический Конгресс (Пущино,

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.

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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Покоящиеся формы бактерий

В цикле развития любого микроорганизма наблюдается смена периода активного размножения и роста на период покоя, при котором процессы репликации отсутствуют, но сохраняется способность возвратиться к активной пролиферации бактерий. Этот цикл развития обеспечивает гомеостаз бактериальной популяции при изменении условий среды обитания (Бухарин и др., 2005).

Известно, что бактерии при неоптимальных условиях роста способны образовывать покоящиеся формы, которые характеризуются значительным снижением активности метаболизма, развитием устойчивости бактериальных клеток к воздействиям различных стрессов и отсутствием клеточного деления. Традиционно состояние покоя бактерий соотносили с формированием высокодифференцированных цист и спор. Однако для неспорообразующих бактерий также была экспериментально доказана возможность перехода в состояние покоя, сопровождающееся формированием менее дифференцированных цистоподобных форм, отличающихся от спор (Мулюкин и др., 2009).

Существует несколько видов покоя: 1 - пролиферативный покой, характеризующийся прекращением деления клетки, но при этом сохраняется некая метаболическая активность (такой тип покоя наблюдается у бактерий в период стационарной фазы роста) (Бухарин и др., 2005); 2 – второй вид покоя сопряжен со значительном замедлением или отсутствием большинства метаболических процессов и реакций. Выделяют несколько стадий бактериального покоя: гипометаболизм (происходит торможение метаболизма, но он остается на детектируемом уровне), аметаболизм (обратимая остановка процессов обмена, характерен для спор микроорганизмов). Также состояние покоя делят на эндогенное и экзогенное в зависимости от локализации индукторов этого явления (Sussman, 1969; Бухарин и др., 2005). Внутренние механизмы организма регулируют эндогенный покой (цисты бактерий, эндо- и экзоспоры, споры грибов, конидии актиномицетов), который является стадией в жизненном цикле и естественной реакцией бактериальной клетки на неблагоприятные факторы окружающей среды (Sussman, 1969). Такие внешние факторы, как низкие температуры/замораживание (криобиоз), высушивание/обезвоживание (ангидробиоз) или выдерживание в растворах осмотически активных веществ, сахарозы или солей (осмобиоз) вызывают экзогенный покой. Такие свойства покоящихся бактерий, как повышенная резистентность к повреждающим

агентам и сохранение пролиферативного потенциала способствует выживанию вида в целом в неоптимальных условиях, что связано с популяционной адаптивностью микроорганизмов. Часто формирование специализированных покоящихся клеток, например бактериальных спор, связано с цитодифференцировкой. Это осуществляется в результате действия генетических программ, вследствие чего образуются формы, характеризующиеся практически полным отсутствием метаболической активности и сильными структурными изменениями (Sussman and Halvorson, 1966). Кроме этого, такие формы отличаются повышенной устойчивостью к действию стрессовых факторов окружающей среды: неоптимальная кислотность и температура, воздействие спиртов, литических ферментов, антибиотиков, токсинов, ионизирующей радиации и т.д. Уровень устойчивости зависит как от способа и вида цитодифференцировки (Калакуцкий and Агре, 1977), так и от реализуемой бактериями стратегии роста (Лойко и др., 2003). Одним из важнейших свойств покоящейся клетки является длительное сохранение ее жизнеспособности с возможностью реверсии в активно делящееся состояние. Очевидно, что для этого при формировании покоящейся формы необходимы довольно сильные структурные изменения бактериальной клетки (Бухарин и др., 2005). Это особенно наглядно продемонстрировано на примере эндоспор кластридий и бацилл. В отличие от эукариотических организмов, прокариоты могут переходить в длительное покоящееся состояние, сопровождающееся значительными структурными перестройками, позволяющими экстремально долго сохранять жизнеспособность клеток, вплоть до миллионов лет (например, в вечной мерзлоте). Разновидности покоя бактерий довольно обширны. Наиболее давно и хорошо изученными являются так называемые специализированные формы, которые различаются между собой по способу образования: микроспоры миксобактерий, конидии стрептомицетов, цисты азотобактера, эндоспоры бацилл, акинеты цианобактерий, экзоспоры и цистоподобные клетки некоторых метанокисляющих и метилотрофных

бактерий. В циклах вегетативного и полового развития грибов также формируются специализированные клетки – споры разных типов. Все эти образования обладают основными чертами, описанными для покоящегося состояния. Среди бактерий наиболее изученными являются эндоспоры *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Clostridium*. Для эндоспор бактерий, которые образуются внутри клетки-спорангия, характерна специфическая структура: внутренняя и наружная споровые мембраны; множественные слои белков; под мембранами расположен кортекс, в состав которого входит модифицированный пептидогликан; споровый протопласт, в котором находятся все субклеточные компоненты, необходимые для прорастания споры и формирования вегетативной клетки. Образование эндоспор является особой формой дифференцировки клеток и сравнимо с фагоцитозом. При этом наблюдается несимметричное деление бактерии септой и дальнейшее поглощение меньшей клетки большей, на следующем этапе наблюдается преобразование поглощенной клетки в спору. В процессе спорообразования выделяют 7 стадий, в каждой из которых происходят значительные физиологические перестройки. Сначала хромосома располагается вдоль длинной оси клетки, затем происходит асимметричное формирование септы, которая разделяет будущую проспору и материнскую клетку, после этого путем двусторонней экзовагинации происходит поглощение проспоры материнской клеткой. В проспоре происходят синтезы кортекса из модифицированного пептидогликана, который располагается между двух мембран и белковых оболочек; затем развивается обезвоживание протопласта и остановка метаболической активности, вследствие чего спора становится термоустойчивой и рефрактерной. Затем происходит выход споры в результате лизиса материнской клетки. Соответствующая группа генов (более 800) контролирует каждую стадию спорообразования. Основные стадии перехода активно делящейся бактерии в покоящуюся сходны для всех типов специализированных форм покоя.

Однако, такие специализированные покоящиеся формы известны для очень ограниченного числа микроорганизмов, в связи с этим возникает интерес к стратегиям и способам переживания стрессовых условий неспорообразующими бактериями, в частности, характерно ли для них состояние обратимого покоя (Бухарин и др., 2005). В 50-х годах Биссет высказал предположение, что все бактерии должны формировать в своем цикле развития покоящиеся формы по типу микроцист (Bisset, 1950). Однако доказательства этой гипотезы были получены гораздо позднее. Покоящиеся клетки неспорообразующих бактерий возникают в результате действия таких же стрессовых факторов, как и характерные анабиотические формы. В них также наблюдаются довольно значительные физиологические и структурные изменения, правда не такие масштабные, как в случае эндоспор. Было показано, что в результате действия факторов d_1 (аутоиндукторов анабиоза) и факторов d_2 (аутоиндукторов автолиза), в бактериальных культурах формируются цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК). Этот факт был обнаружен для дрожжей, а также для грамотрицательных и грамположительных неспорообразующих бактерий. Для ЦПК показано отсутствие экспериментально детектируемой активности метаболизма и повышение устойчивости к действию повреждающих факторов окружающей среды, а также выявлены значительные морфологические изменения по сравнению с активно размножающимися бактериями (Демкина и др., 2000а, 2000б; Эль-Регистан и др., 1979). Факт образования покоящихся форм показан для ряда неспорообразующих микроорганизмов: *Arthrobacter globiformis*, *Escherichia coli*, *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas carboxydoflava*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Micrococcus luteus* и др. (Bakken and Olsen, 1987; McDougald et al., 1998; Демкина и др., 2000а, 2000б; Мулюкин и др., 2009; Сомова и др., 2006; Эль-Регистан и др., 1979).

Очевидно, что переход в состояние покоя может иметь место под влиянием различных стрессовых факторов и наряду с общими чертами обладать

некоторыми особенностями и уникальными регуляторными механизмами для каждой разновидности бактерий.

1.2. «Некультивируемость» как частный случай покоя.

Многие бактерии, в число которых входят и патогенные микроорганизмы, под воздействием различных стрессов внешней среды могут переходить в новое физиологическое состояние, при котором клетки, оставаясь жизнеспособными, утрачивают способность к росту на стандартных плотных лабораторных средах (Oliver, 2009). Такие формы бактерий получили название «жизнеспособные, но некультивируемые клетки» (ЖНК) или как принято их называть в англоязычной литературе «**viable but nonculturable**» (VBNC) (Kaprelyants et al., 1993). Несмотря на довольно низкий уровень метаболической активности, эти формы становятся способными к росту после проведения процедуры реактивации. Бактериальный покой принято рассматривать как нереплицирующееся состояние, при котором бактерии снижают метаболическую активность, выключая интенсивность транскрипции и трансляции (Chao and Rubin, 2010). Жизнеспособность микроорганизмов при отсутствии способности к репликации охватывает спектр различных фенотипов, которые наблюдались у бактерий. Для некоторых бактерий существуют условия *in vitro*, которые ограничивают репликацию, но позволяют бактериям оставаться культивируемыми в стандартных условиях. Другие виды бактерий могут образовывать споры, характеризующиеся отсутствием метаболической активности и чрезвычайной устойчивостью к стрессовым воздействиям со стороны внешней среды. ЖНК состояние, впервые описанное у видов *Vibrio*, а затем обнаруженное у других неспорообразующих бактерий, лежит где-то между этими крайностями. ЖНК состояние определяется отсутствием способности расти на стандартных плотных средах, хотя бактерии остаются жизнеспособными, что определяется специфическим окрашиванием (Kaprelyants and Kell, 1993). При этом, такие бактерии могут восстановить способность к культивированию путем

добавления супернатантов, полученных из активно делящихся культур (Oliver, 2005).

Явление «некультивируемости» бактериальных клеток является предметом интенсивных дебатов в научной литературе (Barer, 1997; Barer et al., 1998; Barer and Harwood, 1999; Kell et al., 1998). Имеется много публикаций, заявляющих о существовании «жизнеспособных, но некультивируемых бактерий», включающих некоторые патогенные штаммы бактерий. Клетки с «некультивируемым» фенотипом могут или поддерживать некоторую детектируемую активность или пребывать в покое, неактивном состоянии. Ранее было найдено, что клетки *Micrococcus luteus*, пребывающие в длительной стационарной фазе содержат большое количество «некультивируемых» клеток, которые остаются в покое в течение нескольких месяцев (Kaprelyants et al., 1993).

До сих пор непонятно, является ли состояние «некультивируемости» адаптацией к выживанию в неблагоприятных условиях или же это этап гибели бактериальной культуры. Существует несколько теорий этого состояния. Nyström предложил **теорию спонтанной клеточной смерти** (Nyström, 2003a) и определил этот процесс, как «старение бактерий, обусловленное внешними факторами». В геноме *E. coli* было выявлено ряд генов, активация которых происходит в стационарной фазе развития культуры и приводит к замедлению процесса старения бактерий. Часть этих генов участвуют в развитии устойчивости к окислительному и тепловому стрессам (Hengge-Aronis, 2002b; Kolter et al., 1993). Экспрессия этих генов контролируется сигма фактором δ^S . Во время стационарной фазы осуществляется регуляция распределения ресурсов между такими процессами, как поддержание роста, сохранение и репарация компонентов клетки (Nyström, 2003a). Такую регуляцию приписывают активности гена *rpoS*, продуктом которого является δ^S субъединица РНК-полимеразы, являющаяся транскрипционным регулятором многих генов, ответственных за устойчивость к стрессам. Имеется еще один сигма-фактор – δ^{70} , участвующий в поддержании жизнеспособности клеток *E.*

coli в отсутствие роста. Интересно, что наблюдается антагонизм в уровне экспрессии δ^S и δ^{70} сигма-факторов, избыточная экспрессия одного из них подавляет экспрессию второго (Farewell et al., 1998). Качество окружающей среды и нуклеотид ppGpp регулируют этот антагонизм. При низких концентрациях ppGpp наблюдается экспрессия генов, находящихся под регуляцией сигма-фактора δ^{70} , а повышенный уровень этого нуклеотида (в результате воздействия неблагоприятных условий) активирует фактор δ^S и помогает ему конкурировать за РНК-полимеразу (Nyström, 2003a). В стационарной фазе роста негативное влияние на состояние бактерий оказывают различные окислительные процессы. Чаще всего, окислению подвергаются белки, синтезированные в результате ошибок в транскрипции или трансляции и имеющие доступные для окислителей группы из-за неправильного формирования вторичной и третичной структур, которые при нормальном синтезе белка скрыты (Dukan et al., 2000; Nyström, 2001, 2003b, 2003a). Подобные окислительные повреждения не приводят к увеличению синтеза белков окислительного стресса. Таким образом, увеличение числа окисленных белков не всегда является следствием повышения концентрации активных форм кислорода и неэффективности систем его дезактивации (Dukan et al., 2000). Увеличение доли окислительных повреждений белков приводит к активации фактора δ^S , благодаря которому их процент понижается (Dukan and Nyström, 1999). Однако, в глубокой стационарной фазе окислительные процессы достигают такого масштаба, что это приводит к развитию обратимой «некультивируемости» культур, а затем и к смерти бактериальных клеток.

Вторая **теория**, объясняющая развитие «некультивируемого» состояния у бактерий основана на идее **программируемой клеточной смерти**. Было продемонстрировано, что в бактериальных клетках имеются локусы, состоящие из парных генов, белковыми продуктами которых являются так называемые «токсин» и «антитоксин». С помощью белок-белковых взаимодействий молекулы «антитоксина» могут нейтрализовать соответствующий «токсин». Такие генные участки могут быть

множественными и находится как в плазмидах, так и в хромосоме. Так, в хромосоме *E. coli* имеется пять подобных локусов (Nyström, 2003b). Обычно белок «токсина» более стабилен, чем «антитоксина», и если, не будет соответствующего баланса, бактериальная клетка погибает (Gerdes et al., 1997, 2005). Высказано предположение, что благодаря этим локусам запускаются процессы, вызывающие программируемую клеточную смерть. В связи с этим показано, что гиперпродукция белка MazF, являющегося «токсином» в паре MazEF, где MazE – «антитоксин», приводит к значительному числу колоний при росте на плотных средах. А при повышении концентрации ppGpp наблюдается снижение уровня транскрипции оперона mazEF, в результате более стабильный «токсин» не сдерживается «антитоксином» и наблюдается гибель клеток (Aizenman et al., 1996; Nyström, 2003a, 2003b). Было предположено, что подобный механизм регуляции смерти большей части популяции, дает шанс оставшимся микроорганизмам выжить в стрессовых условиях и необходим для выживания вида в целом (Aizenman et al., 1996). Поскольку транскрипция генов оперона mazEF активируется в логарифмической фазе роста культур в условиях стресса, предположили, что «токсин-антитоксин» (ТА) пары не убивают бактериальные клетки, а участвуют в регуляции основных процессов, таких как трансляция или репликация, в условиях блокирования ростовых функций (Nyström, 2003b, 2003a). В то же время было показано, что сверхпродукция токсинов RelA и MazF является не бактериоцидной, а скорее бактериостатической в отношении клеток *E. coli* и переводит их в состояние, при котором они еще живы, но не способны к росту на плотных средах. Это явление полностью исчезает в случае увеличения уровня экспрессии соответствующих «антитоксинов». Таким образом, ТА – системы являются глобальными регуляторами активности клеточных процессов и не зависят от ppGpp (Pedersen et al., 2002).

И, наконец, существует еще одна **теория**, связанная с **формированием ЖНК форм бактерий** для длительного переживания стрессовых условий окружающей среды. Согласно этой теории переход бактерий в

«некультивируемое» состояние является стратегией переживания, которую реализует бактериальная клетка в ответ на давление неблагоприятных условий окружающей среды, таких как осмотический или окислительный шок, недостаток питательных веществ, неоптимальные температурные воздействия (Currás et al., 2002). Подобное состояние описано для *Micrococcus luteus* (Mukamolova et al., 2003) и сопоставимо со спорообразованием (Roszak and Colwell, 1987b, 1987a). Жизнеспособные «некультивируемые» бактерии сохраняют структурную целостность, но обладают сниженной метаболической активностью и не способны расти на стандартных лабораторных средах (особенно это свойство проявляется на плотных средах). Для восстановления способности расти и образовывать колонии необходимо проведение процедуры реактивации таких ЖНК форм. Формирование «некультивируемых» форм описано для многих бактерий (Oliver, 2005). Развитие «некультивируемого» состояния может быть вызвано факторами, которые используются в качестве бактерицидной обработки, например пастеризация молока (Gunasekera et al., 2002) или хлорирование воды (Oliver et al., 2005). Жизнеспособность таких форм устанавливается с помощью применения различных методов выявления целостности мембран и метаболической активности, а также обратным их переводом в активное состояние (Mukamolova et al., 2003; Oliver, 2005). Явление «некультивируемости» довольно широко распространено в мире микроорганизмов. Показано, что многие патогенные бактерии, попадая во внешнюю среду, образуют «некультивируемые» формы. Это явление может быть вызвано недостатком питательных веществ в воде, пониженными значениями температуры, влиянием других микроорганизмов (Aulet et al., 2007; Николеишвили Л.Р., 2004; Романова et al., 1998; Солохина et al., 2001) и хлорированием водопроводной воды (Lee et al., 2007). Продемонстрировано, что способность переходить в «некультивируемое» состояние является штаммоспецифичной характеристикой. Так, не все штаммы *Campylobacter jejuni* могут образовывать «некультивируемые» формы (Tholozan et al., 1999).

Наряду с водной средой, ЖНК формы бактерий могут возникать и в аэрозоле, как показано для *Serratia marcescens* (Heidelberg et al., 1997). Индукция образования «некультивируемого» состояния у патогенных бактерий может происходить в результате использования антибиотиков, что установлено для *Helicobacter pylori* (Bode et al., 1993; Cellini et al., 1994). Пробиотические бактерии, например *Lactococcus lactis*, также способны переходить в ЖНК состояние, при этом сохраняя некоторый уровень метаболической активности (Ganesan et al., 2007). Было показано, что недостаток углеводов может индуцировать этот переход. В зависимости от особенностей углеводного обмена наблюдается разнообразие между штаммами по времени образования ЖНК форм и оно варьирует от одной недели до 3-х месяцев (Ganesan et al., 2007). Переход бактерий в «некультивируемое» состояние обычно сопровождается уменьшением размеров клеток и значительными изменениями в их метаболизме, которые проявляются в понижении уровней дыхания, синтеза макромолекул, а также снижается активность трансмембранного транспорта (Porter et al., 1995). При этом метаболизм полностью не останавливается, а синтезируются различные стрессорные белки, обеспечивающие выживание бактерий в неоптимальных условиях (Oliver, 2005). Для некоторых штаммов *Vibrio vulnificus* было показано *in vitro* и *in situ*, что в ЖНК состоянии сохраняется экспрессия ряда генов, в частности, *rpoS* и *katG*, что коррелирует с чувствительностью «некультивируемых» бактерий к активным формам кислорода (Smith and Oliver, 2006). Было обнаружено, что спустя 4.5 месяцев хранения в «некультивируемых» формах *Vibrio vulnificus* наблюдается экспрессия некоторых генов, хотя их отношение к ЖНК состоянию не установлено (Saux et al., 2002). Для культуры *Shigella dysenteriae* 1-2 месячного возраста установлено наличие активного транспорта метионина и его включение в состав белков (Rahman et al., 1996). В период «некультивируемости» происходят заметные изменения в клеточной стенке бактерий. Изменяется состав жирных кислот в цитоплазматической мембране, что отражается на значении мембранного потенциала (Oliver, 2005). В

клеточной стенке ЖНК форм в отличие от активно растущих бактерий наблюдается увеличение числа межпептидных связей и происходит 3-х кратное увеличение ДАП-ДАП связей и укорочение гликановых цепей, а также возрастает доля липопротеидов, ковалентно связанных с муропептидами (Signoretto et al., 2002). Для многих патогенных микроорганизмов (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, энтеропатогенные штаммы *E. coli* и др.) сохраняется активность факторов вирулентности в состоянии «некультивируемости». ЖНК формы таких бактерий оказались способны синтезировать токсины, а у некоторых видов сохраняется способность к адгезии (Maalej et al., 2004; Rahman et al., 1996; Vora et al., 2005). Так клетки *Streptococcus parauberis* сохраняли вирулентные свойства через 4 месяца после образования ЖНК форм (Currás et al., 2002). Пребывая в «некультивируемом» состоянии клетки *Vibrio cholerae* способны продуцировать токсин и при попадании в организм хозяина довольно быстро переходят в активное состояние (Haque et al., 1970). Таким образом, ЖНК микроорганизмы способны вызывать заболевания, но при этом не детектируются традиционными методами посевов.

Переход бактерий в состояние покоя и «некультивируемости» играет важную роль в выживании микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Благодаря этому адаптивному механизму бактерии могут свести к минимуму повреждения клеточных структур в стрессовых условиях и сохранять потенциал к реактивации длительный период времени.

Способность патогенных и условно патогенных бактерий образовывать ЖНК формы затрудняет диагностику заболеваний, которые они вызывают, а также их обнаружение в природных резервуарах. Поскольку в таких адаптированных к стрессу бактериях сохраняется вирулентность, это может привести к возникновению заболевания, вызванного ЖНК клетками. Однако только в

относительно немногих случаях показан переход таких бактерий к нормальному, жизнеспособному (культивируемому) состоянию. Подавляющее большинство опубликованных экспериментов четко не демонстрируют реактивацию некультивируемых бактерий (Kell et al., 1998). Пока такие ЖНК бактерии не будут реактивированы их микробиологическое и медицинское значение остается под вопросом.

1.3. Покой, персистенция и латентность: сходство и различия на примере возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*

Хотя термины «покой», «персистенция» и «латентность» часто используются в литературе как взаимозаменяемые, они отражают различные явления, которые могут быть фенотипически похожи.

Среди видов бактерий, которые вызывают эпидемические заболевания человека, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), являющийся возбудителем туберкулеза (ТБ), особенно успешен. *Mtb* обладает уникальной способностью вызывать скрытую инфекцию, в результате чего развивается латентная форма туберкулеза. Известно, что одна четверть населения мира латентно инфицирована *Mtb*, в результате чего создается огромный потенциал в плане реактивации заболевания и его последующего распространения (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>).

Латентность, как определение, используется для характеристики заболевания, в частности туберкулеза, в случаях, когда наличие возбудителя диагностируют специфическими тестами (такими, как туберкулиновая кожная проба, диаскин тест или квантифероновый тест) при отсутствии клинических или радиографических проявлений болезни (Salgame et al., 2015). Эту форму заболевания очень трудно изучать, так как бактерии недоступны и проблематичны для визуализации в организме пациентов. В общих чертах, туберкулезные бациллы не высеваются из мокроты и других биологических образцов латентно инфицированных людей (Sia and Wieland, 2011). Такое поведение бактерий связывают с их переходом в состояние покоя под

воздействием совокупности стрессовых факторов (ответ со стороны иммунной системы, антибиотикотерапия, недостатком кислорода и некоторых питательных субстратов). В связи с этим возникла необходимость исследовать такой бактериальный фенотип, как переход микобактерий в покоее состояние и реактивация из него.

Под **покоющимся состоянием** мы понимаем такое *обратимое* состояние бактериальной клетки, при котором происходит значительное снижение уровня метаболической активности, а бактериальная клетка способна сохранять жизнеспособность длительное время в таком состоянии без размножения (Kaprelyants et al., 1993). Покой *Mtb* может приводить к двум явлениям при течении ТБ у человека: во-первых, субпопуляция покоеющихся бактерий может быть ответственна за развитие латентного ТБ и, во-вторых, устойчивость к медикаментам и высокие показатели рецидивов, наблюдаемые при лечении антибиотиками, направленными против активного ТБ. Тем не менее, важность покоя микобактерий и их реактивация при заболевании остается неясной. Фактически механизмы, лежащие в основе обоих этих явлений, остаются спекулятивными. Тем не менее, понимание молекулярной основы покоя и реактивации *Mtb* является необходимым для выяснения их значения в случае ТБ у человека.

Имеется две альтернативные модели перехода микобактерий в состояние покоя в организме хозяина. В стохастической модели субпопуляция клеток переходит в состояние покоя независимо от окружающей среды. Альтернативно, покой микобактерий может быть вызван сигналами, генерируемыми в ответ на стрессовые сигналы окружающей среды. Заражение человека происходит воздушно-капельным путем вдыхания аэрозолей, содержащих клетки *M. tuberculosis*, выделяемые инфицированными людьми. Бактерии поглощаются в основном альвеолярными макрофагами, которые служат основной нишей для роста бактерий (Hirsch et al., 1994). У большинства людей эта первичная инфекция в конечном итоге контролируется активацией адаптивного иммунитета. Ответы CD4 и CD8

необходимы для контроля *Mtb*, как для создания длительного иммунитета, так и для генерации цитокинов, таких как гамма-интерферон, которые имеют решающее значение для ограничения роста бактерий (Caruso et al., 2019; Daley et al., 1992; Flynn and Chan, 2001). Макрофаги, активируемые гамма-интерфероном, подавляют внутриклеточный рост бактерий (Flynn et al., 1993). В макрофагах мышей NO, по-видимому, является основным медиатором ограничения микобактериального роста (Chan et al., 1995; MacMicking et al., 1997). В организме хозяина имеются и другие факторы, включая антимикробные пептиды (Liu et al., 2006), которые также могут играть важную роль в сдерживании роста бактерий. На начальных стадиях заражения наблюдается воспалительный процесс и гибель нейтрофилов и макрофагов, а также разрушение легочной ткани токсичными иммунными продуктами, что приводит к возникновению казеозного некроза, на котором живет и делится внеклеточный *Mtb*. Вокруг некротического ядра находится смесь лимфоцитов, активированных макрофагов и фибробластов (Russell, 2007; Saunders and Britton, 2007). Из-за плохой перфузии это образование (гранулема) считается гипоксической. Действительно, модели на множестве животных с патологией, сходной с туберкулезом человека, показали образование гранулем, в которых развивается гипоксия (Via et al., 2008). Эта структура, гранулема, является отличительной чертой туберкулеза и имеет решающее значение для ограничения распространения инфекции (Schnappinger et al., 2003). Для многих людей прогрессирование заболевания на этой стадии останавливается, что приводит к длительному латентному периоду. Выявление культивируемого *Mtb* у латентно инфицированных людей чрезвычайно сложно, что указывает либо на низкую концентрацию бактерий в период латентности, либо на изменение их физиологического состояния. Тем не менее, латентная форма болезни может перейти в активный процесс вследствие так называемой реактивации. Некоторые данные свидетельствуют о том, что *Mtb* сохраняется у людей в течение продолжительных периодов времени. Исторически, до появления химиотерапии, туберкулез у многих

людей протекал в виде множественных эпизодов латентного периода и спонтанной реактивации. Лизаты из гранулем, выделенных у латентно инфицированных пациентов, могут инфицировать морских свинок, и они, по-видимому, содержат микобактерии (Opie, 1927). Молекулярное доказательство для длительной персистенции *Mtb* собрали датские исследователи путем анализа фрагментного полиморфизма штаммов возбудителя ТБ. Оказалось, что штаммы *Mtb*, собранные у пациентов в 1990-х годах были идентичны или очень похожи на каталогизированные штаммы, собранные в 1960-х годах (Lillebaek et al., 2003). Эти штаммы были обнаружены у пожилых людей, которые были, вероятно, впервые заражены *Mtb* десятилетия назад и не проявляли видимых симптомов заболевания вплоть до реактивации латентного ТБ в 1990-х годах. На самом деле, типирование штамма показало, что пациент был латентно инфицирован около 33 лет после первичного заражения (Lillebaek et al., 2002). Лечение латентного туберкулеза требует расширенного курса антибиотиков. Даже использование комбинированной терапии требует нескольких лет лечения; более короткие курсы приводят к высокой частоте рецидивов. Исследования на животных позволяют предположить, что этот слабый ответ на антибиотики может быть частично обусловлен очень устойчивой к лекарствам субпопуляцией бактерий. Иногда известные как персистеры (Wallis et al., 1999), эти бактерии могут частично состоять из покоящихся клеток, которые также ответственны за латентность.

Понятие **персистенция** означает длительное переживание бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний в организме хозяина. Такое состояние микроорганизмов, позволяющее сохранять жизнеспособность популяции в условиях стресса, характеризуется их устойчивостью к стрессовым физико-химическим факторам внешней среды, формированием стабильных антагонистических эффектов в биоценозе и приобретением устойчивости к защитным механизмам иммунной системы хозяина (Бухарин, 2008). Понятие «персистеры» было впервые применено для характеристики

небольшого количества клеток *Staphylococcus*, которые способны выживать в процессе длительного лечения пенициллином (Bigger, 1944). В дальнейшем, это определение было использовано для возбудителя ТБ и основывается на способности генетически чувствительных к антибиотикам бактерий выживать в организме хозяина после лечения лекарственными препаратами (McDermott, 1969). Для персистирующих бактерий не характерна генотипическая резистентность, и, после активации из состояния персистенции даже обычная ингибирующая концентрация антибиотиков приводит к гибели таких бактерий (Lewis, 2007).

Возникновение персистентных форм под действием антибиотиков продемонстрировано наравне с микобактериями для ряда патогенных микроорганизмов - *Streptococcus pneumoniae* (Rieger et al., 2017), *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* (Balaban et al., 2004), *Treponema pallidum* (Yogeswari and Chacko, 1971), *Streptococcus pyogenes* (Wood et al., 2005). Было обнаружено, что скорость гибели бактерий под действием антибиотиков пропорциональна метаболической активности микроорганизмов и скорости их деления (Tuomanen, 1986).

В ряде экспериментов обнаружено, что возбудитель латентного ТБ характеризуется «некультивируемым» фенотипом. Так при геномном секвенировании клеток *Mtb*, выделенных из образцов обезьян с латентной формой ТБ, были обнаружены множественные мутации в геноме бактерий, что связали с влиянием окислительного стресса, при этом эти формы не высевались на стандартных лабораторных средах (Ford et al., 2011). Подобные результаты были получены в ряде работ (Lillebaek et al., 2002, 2003) (Colangeli et al., 2014).

Можно сказать, что персистенция микобактерий возникает как результат взаимодействия с антибиотиками, а появление покоящихся форм возбудителя латентного ТБ отражает активность иммунной системы организма хозяина. Эти феномены в какой-то степени отражают аналогичные физиологические состояния микобактерий и, по всей вероятности, фенотипически связаны. В

отличие от покоящихся форм, персистирующие бактерии более чувствительны к пипразинамиду и рифампицину (ингибирование синтезов РНК), но не к изониазиду (ингибирование синтеза клеточной стенки). Но в том, и другом случае развивается устойчивость к ряду противотуберкулезных препаратов, что является их главной общей характеристикой.

1.4. Адаптивные механизмы выживания *M. tuberculosis* внутри макрофага хозяина при первичном заражении.

Как уже отмечалось, альвеолярные макрофаги поглощают микобактерии при первичном заражении и 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, а также в активированных макрофагах наблюдается развитие низких значений pH (Uradhyay, 2018). Хотя макрофаги и эффективны в плане подавления жизнеспособности большинства бактерий, в случае микобактерий развивается ряд адаптивных к условиям макрофага стратегий, позволяющих клеткам возбудителя ТБ противостоять действию иммунной системы хозяина. Когда макрофаг захватывает клетку *Mtb*, она распознается поверхностными рецепторами макрофага семейства интегринов CR1 и CR3 (Ahearn and Fearon, 1989) и маннозил рецепторами (Schlesinger, 1993). Эти рецепторы не универсальны для всех видов микобактерий. Так *Mycobacterium avium* захватывается макрофагом благодаря другому рецептору семейства интегринов - $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Rao et al., 1993). Отдельные штаммы *Mtb* могут различаться между собой по способности связывания с разными участками рецептора CR3 (Ernst, 1998). Было обнаружено, что маннозные рецепторы взаимодействуют с вирулентными штаммами *Mtb* Эрзмана и H37Rv, но не узнают невирулентный штамм *Mtb* H37Ra, поскольку клетки штамма H37Ra не имеют специфического лиганда (а именно ЛАМ), узнаваемого этим типом рецепторов (Schlesinger et al., 1996).

При попадании в макрофаг хозяина клетки микобактерий способны: 1) ингибировать слияние лизосомы и фагосомы; 2) препятствовать развитию за кислению в фагосоме и ее созреванию; 3) экспрессировать белковые факторы вирулентности семейства PE-PGRS (repetitive glycine-rich protein), благодаря которым обеспечивается процесс репликации в условиях макрофага (Ramakrishnan et al., 2000). Рассмотрим их более подробно:

- ингибирование слияния лизосомы и фагосомы

Подавление роста и дальнейшее уничтожение бактериальных клеток внутриклеточных патогенов зависит от слияния лизосомы с фагосомой в клетках мононуклеарных фагоцитов иммунной системы хозяина (Wei et al., 2000). В процессе захвата патогенных бактерий макрофагом, большинство из них попадает в фаголизосому (Mcdonough et al., 1993). Но многим микобактериям удается перейти в вакуоль из фагосомы и благодаря этому избежать дальнейшей гибели из-за слияния с вторичными лизосомами. Даже кратковременное взаимодействие с фаголизосомой инициирует запуск ответа клеток *Mtb* на действие стрессовых факторов и стимулирует активацию процессов, участвующих в переходе микобактерий в состояние покоя, вследствие этого обеспечивается длительное выживание патогена в организме хозяина с возможностью возобновления роста. Ингибирующий эффект на слияние лизосомы и фагосомы оказывают анионы трегалозы гликолипидов *Mtb* (сульфатиды) (Goren, 1977). Также *Mtb* способен к продукции аммиака в значительных количествах, вследствие дезаминирования аминокислот, что приводит к торможению процесса слияния фагосомы и лизосомы (Gordon et al., 1980). В присутствии хлорида аммония наблюдается защелачивание содержимого лизосомы, что отрицательно сказывается на лизирующих свойствах ее ферментов тем самым нарушая работу лизосомы (Hart et al., 1983). Было обнаружено, что при низких концентрациях Ca^{2+} в цитозоле происходит торможение слияния фагосомы с лизосомой, что благоприятно влияет на адаптацию *Mtb* к условиям макрофага. Этот эффект наблюдается

вследствие нарушения активации Ca^{2+} - зависимого эффекторного белка кальмодулина, а также кальмодулин-зависимой протеинкиназы-2, что приводит к успешности внутриклеточного переживания возбудителя ТБ (Malik et al., 2001).

- ингибирование созревания и закисления фагосомы

Как упоминалось выше, микобактерии способны выходить из фагосомы в вакуоль макрофага, вследствие этого *Mtb* избегает действия литических ферментов, поскольку вакуоли не способны сливаться с лизосомами. Микобактерии влияют на активность везикулярной АТФазы макрофага и тем самым сдерживают процесс закисления (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Возбудитель ТБ способен нарушать синтез фагосомального белка Rab5, что отрицательно влияет на процесс созревания фагосомы (Clemens et al., 2000). Кроме этого, микобактерии способны удерживать на поверхности фагосомы триптофан-аспартат содержащий белок оболочки (ТАСО), что приводит к нарушению слияния фагосомы с лизосомой (Ferrari et al., 1999). ТАСО является актин-связывающим белком, который взаимодействует с холестерином плазматической мембраны (Gatfield and Pieters, 2000). На интенсивность транскрипции ТАСО влияют определенные концентрации ретиноевой кислоты и витамина D3, поэтому предлагается их использовать в комбинированной терапии ТБ (Anand and Kaul, 2003).

- факторы вирулентности клеточной стенки

Микобактерии относятся к кислотоустойчивым бактериям, поскольку не обесцвечиваются солянокислым этанолом при окрашивании по Граму. Это свойство является результатом высокого содержания длинноцепочечных жирных кислот с перекрестными сшивками, миколовых кислот и других липидов в микобактериальной клеточной стенке (Daffe and Draper, 1997). Под миколовыми кислотами и другими сложными липидами, образующими внешнюю микомембрану находятся слои пептидогликана и арабиногалактана (Chiaradia et al., 2017). Такие уникальные липиды, как трегалоза димиколат, тиоцерол димикоцерат, липоарабиноманнан (ЛАМ) нековалентно связаны с

внутренней мембраной микобактерий и играют значимую роль в вирулентности *Mtb* (Glickman and Jacobs, 2001). Корд фактор, представляющий собой поверхностные гликолипиды, являющиеся токсичными для клеток млекопитающих вследствие участия в ингибировании миграции полиморфно-ядерных лейкоцитов, также относится к факторам вирулентности микобактерий (Devergne et al., 1992; Indrigo et al., 2003). Этот пул липидов необходим для нормального развития микобактериальной клетки. Так, при нарушении работы гена, продуктом которого является миколат/корд-фактор, наблюдается снижение скорости роста клеток *Msm* (Liu and Nikaido, 1999). Штамм *Mtb* с делецией гена, продукт которого участвует в циклопропанировании миколовых кислот отличался сниженной вирулентностью и изменением свойств клеточной стенки (Glickman et al., 2000). Показано, что нарушение синтеза фтиоцерол димикоцерата (компонент, необходимый для биосинтеза клеточной стенки) приводит к снижению скорости роста клеток *Mtb in vitro* (Cox et al., 1999). Было продемонстрировано, что фтиоцерол димикоцерат связывается с белком ламинином нервной клетки и обеспечивает взаимодействие *Mycobacterium leprae* с периферическими нервными клетками (Ng et al., 2000). Еще одним мажорным компонентом микобактериальной клеточной стенки является ЛАМ, регулирующий синтез фактора некроза опухоли (TNF - tumor necrosis factor), который синтезируется макрофагами (Chatterjee et al., 1992) и способен запускать цепочку иммунных реакций, которые, в конечном итоге, приводят к уничтожению чужеродных бактерий. Кроме этого, ЛАМ способен обезвреживать действие токсичных свободных радикалов кислорода, ингибирующих активность протеинкиназы С, а также ингибировать транскрипцию гена, кодирующего человеческий гамма-интерферон (γ INF), что способствует выживанию *Mtb* в мононуклеарных фагоцитах (Chan et al., 1991).

Еще одним адаптивным механизмом для выживания микобактерий в условиях организма хозяина является **способность образовывать покоящиеся формы**, сохраняющие потенциал к реактивации и дальнейшему

размножению. Находясь в состоянии покоя или персистенции *Mtb* способен избегать активных действий со стороны иммунной системы хозяина. Было обнаружено, что в процессе пребывания *Mycobacterium marinum* в макрофагах, а в последствие в гранулемах, в клетках этого патогена повышается экспрессия ряда специфических генов (Ramakrishnan et al., 2000). Особое внимание привлекли гены, кодирующие глицин-богатые белки PE/PE-PGRS. Штамм *M. marinum* с делецией двух генов, кодирующих PE-PGRS белки, был не способен к размножению в условиях макрофага и характеризовался низким уровнем персистенции в условиях гранулемы, что указывает на важность этих белков в механизме вирулентности микобактерий (Ramakrishnan et al., 2000).

В активированных макрофагах создаются условия, направленные на уничтожение захваченной бактерии, в связи с этим в них также производятся активные формы кислорода и азота. Однако микобактерии выработали стратегии, позволяющие выжить в таких условиях. Так, клетки *Mtb*, гиперэкспрессирующие белок Sma1, участвующий в циклопропанации миколовых кислот по двойной связи, обладают повышенной устойчивостью к действию перекисей (Yuan et al., 1995). В условиях окислительного стресса в клетках *Mtb* происходит активация транскрипционного регулятора oхyR, который инициирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты детоксикации – каталазу и гидропероксидазу (Sherman et al., 1995), а также важная роль в защите микобактерий от окислительного стресса принадлежит супероксиддисмутазам (Dussurget et al., 2001). Но при этом, в литературе встречаются заявления, что тщательный анализ генома *Mtb* продемонстрировал, что в клетках *Mtb* не хватает классических редокс-сенсоров, таких как FNR, FixL и OхyR (Bhat et al., 2012). Однако *Mtb* оснащен различными сложными окислительно-восстановительными датчиками, которые могут обнаруживать различные виды окислительно-восстановительного стресса, включая гипоксию, оксид азота, окись углерода и внутриклеточный окислительно-восстановительный статус. Некоторые из этих сенсоров, такие как DosS и DosT на основе гемов, являются уникальными

для микобактерий, тогда как другие, такие как белки WhiB и анти- σ -фактор RsrA, уникальны для актинобактерий (Bhat et al., 2012).

Таким образом, очевидно, что возбудитель ТБ является успешным патогеном, который в процессе адаптации к агрессивным условиям макрофага выработал ряд стратегий и механизмов, позволяющих ему выжить несмотря на активность иммунной системы хозяина.

1.5. Моделирование нерепликативного состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

С целью изучения свойств возбудителя латентного ТБ в условиях организма животных было разработано несколько моделей *in vivo*, имитирующих эту форму заболевания. Преимущество этих моделей заключается в непосредственном участии иммунной системы зараженного животного в регуляции процесса протекания латентной формы заболевания. Поскольку имеются существенные индивидуальные различия в активности иммунной системы у разных индивидуумов, не говоря уже о разных видах макроорганизмов, это может быть недостатком таких моделей. Неоспорима ценность данных, выявленных с помощью мышинных моделей *in vivo*, однако, имеются существенные различия в функционировании иммунной системы мышей и человека. Но эти модели получили достаточно широкое распространение, так как при инфицировании мышей клетками *Mtb* наблюдается схожий с человеческим ответ со стороны иммунной системы, протекающий с участием Т1-хелперов (Mcmurray et al., 1996). Кроме мышей, для создания моделей ТБ *in vivo* используют морских свинок и кроликов (Mcmurray et al., 1996). Модели, полученные *in vivo*, играют, без сомнения, большую роль в изучении патогенеза заболевания и ответов со стороны иммунной системы хозяина. Тем не менее, с их помощью невозможно провести системное исследование особенностей биохимии и физиологии возбудителя ТБ. В связи с этим очевидна необходимость разработки моделей

in vitro, отражающих ответ микобактерий на воздействие стрессовых факторов, приближенных к реальной ситуации *in vivo*. Несмотря на то, что в моделях *in vitro* невозможно воспроизвести одновременно весь спектр стрессового воздействия, с которым сталкивается патоген в организме хозяина, они обладают рядом преимуществ, которые играют важную роль в создании представления об адаптационных возможностях возбудителя ТБ и полученные знания могут быть использованы в разработке новых методов диагностики и иррадикации этого патогена. К таким преимуществам относятся удобство проведения исследований и относительная простота воспроизведения условий, вследствие которых образуются идентичные стрессированные микобактерии в количествах, достаточных для проведения различных исследований их физиологии и биохимии. Совокупность знаний, полученных с использованием моделей *in vivo* (решаются проблемы патогенеза заболевания и ответов организма хозяина) и *in vitro* (исследуются возможности патогена в условиях, приближенных к условиям организма хозяина) позволит получить целостную картину механизмов развития латентной формы заболевания и ее активации.

С целью изучения механизмов длительной персистенции и выживания микобактерий в течении десятилетий в организме хозяина в период латентного ТБ были предприняты попытки воспроизвести состояние возбудителя этого заболевания в различных условиях *in vitro*. В итоге разработано несколько моделей, в разной степени отражающих ответ микобактериальной клетки на действие стрессовых факторов. Остановимся подробнее на основных подходах.

Одним из первых подходов, применяемых для создания моделей *in vitro* является ограничение микобактериальной популяции по каким-либо питательным субстратам. К таким моделям относится, например, длительное пребывание бактерий в стационарной фазе развития культуры в закрытой

системе, когда в ходе естественного роста микроорганизмов наблюдается существенное истощение питательных компонентов среды.

Наиболее ранней моделью (разработана в 1933 г.) является модель голодания Лёбеля. Было предположено, что, пребывая в некротической гранулеме клетки *Mtb* голодают вследствие недостатка питательных веществ. На основании этого предположения была разработана модель старвации, 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 показали снижение активности дыхания и уровня экспрессии ряда генов (Betts et al., 2002).

Кроме этой модели, разработаны еще некоторые подходы, связанные с лимитированием питательных компонентов в среде роста микобактерий. Так, исключение калия приводило к появлению «некультивируемых» форм бактерий, которые были способны к реактивации при перенесении в свежую сбалансированную среду (Salina et al., 2014). Однако полученные в условиях отсутствия калия формы *Mtb*, не способны к длительному хранению, что не вполне соответствует ситуации, характерной для возбудителя латентного ТБ, который способен десятилетиями сохраняться в организме хозяина без видимых признаков активации. Впрочем, это и не удивительно, поскольку трудно себе представить условиях отсутствия калия в организме хозяина. Поскольку калий относится к жизненно-важным элементам вследствие его огромной роли в различных биохимических процессах клетки (модуляция активности ферментов, регуляция синтеза нуклеиновых кислот, транспортные процессы, синтезы АТФ, поддержание окислительно-восстановительного баланса клетки), то возникает вопрос, являются ли полученные формы микобактерий покоящимися или образующееся кратковременное состояние «некультивируемости» является направлением к гибели популяции бактериальных клеток при таком жестком лимитировании необходимого

элемента для нормального функционирования метаболизма. Дефицит калия вызывает остановку деления бактерий и прекращение биосинтетических процессов (вследствие чего неудивительно отсутствие действия известных антитуберкулезных препаратов), но тот факт, что такие формы не способны к хранению и быстро погибают или начинается вторичный рост в культуре наводит на мысль, что клетке не хватило ресурсов должным образом перестроиться и подготовиться к длительному хранению в условиях стресса. Скорее это состояние напоминает феномен «клинической смерти», когда объект практически мертв, но его еще возможно до определенного времени реанимировать.

Развитие «некультивируемости» у микобактерий является важным свойством возбудителя ТБ при латентной форме заболевания, и это явление было также продемонстрировано с использованием моделей *in vivo* (Dhillon et al., 2004; Sala et al., 2010), однако это свойство не является неизменным признаком покоя у бактерий и может указывать на повреждающие процессы, происходящие с бактериальной клеткой. Например, накопление большого процента окисленных белков или токсических соединений внутри такой клетки может вызвать явление «некультивируемости».

Разработана модель, в которой в среде выращивания клеток *Mtb* отсутствовали углеродные субстраты. При этом рост микобактерий останавливался и развивалась устойчивость клеток к действию парааминосалициловой кислоты и изониазида (Hobby and Lenert, 1957).

Было исследовано влияние ряда антибиотиков (15 препаратов с различным спектром действия) на инактивацию «голодающих» форм *Mtb*, помещенных в фосфатный буфер на полтора месяца (Xie et al., 2005). Обнаруженная низкая восприимчивость таких бактерий к изониазиду указывает на отсутствие синтетических процессов клеточной стенки в этих условиях. Но, в тоже время, выявленная чувствительность к действию рифампицина указывает на активность транскрипционных процессов в период нерепликативного состояния. Из фенотиазинового ряда только трифлуоропиразин и хлорпромазин

обладали бактерицидным действием (в концентрации 40 мкг/мл) в отношении бактериальных клеток, подвергшихся голоданию (Xie et al., 2005). В работе Беттс с соавт. показано, что в условиях голодания происходит заметное снижение активности процессов транскрипции, биосинтеза липидов и энергетического метаболизма (Betts et al., 2002). Однако наличие чувствительности к некоторым антибиотикам указывает на присутствие активных процессов в таких нерепликативных формах микобактерий, например, синтеза РНК.

Базируясь на утверждении, что в организме хозяина возбудитель ТБ подвергается воздействию совокупности стрессовых факторов, была разработана модель множественного стресса. В этом случае микобактерии подвергались одновременному действию нескольких факторов: высокая концентрация CO₂ (свыше 10%), низкий уровень O₂ (до 5%), десятикратно пониженные концентрации питательных субстратов (среда Дюбо 10%) и низкое значение pH среды (pH 5.0) (Deb et al., 2009). В этой модели наблюдалось ограничение роста *Mtb*, при этом клетки приобретали чувствительность к действию кислот и накапливали вещества липидной природы. По прошествии 18 суток пребывания микобактерий в условиях множественного стресса, в них развивается фенотипическая устойчивость к 0.8 мкг/мл изониазида (в популяции выживает 84% бактерий) в то время, как при воздействии рифампицином (5 мкг/мл) устойчивы только 12%. Если снизить концентрацию рифампицина до 0.1 мкг/мл, то все клетки (100%) оставались живыми. Транскрипционный анализ полученных форм выявил значительное снижение экспрессии генов, участвующих в биосинтетических путях, а также в процессах транскрипции и трансляции, при этом происходит повышенная экспрессия генов «строгого ответа» (stringent response) (Deb et al., 2009).

Витамин С был использован в качестве стрессового фактора для создания еще одной модели нерепликативного состояния *Mtb*. В этом случае аскорбиновую кислоту добавляли в культуру бактерий в концентрации 10 мМ,

что имитирует условия активированного макрофага (Taneja et al., 2010). В таких условиях размножение микобактерий останавливалось, а полученные формы бактерий становились устойчивы к действию изониазида, но при этом оставались чувствительными к рифампицину. Транскрипционный анализ выявил повышенную экспрессию генов, входящих в DosR регулон, а также его регулятора Rv3134c/DevR. Было показано, что возрастает уровень транскрипции генов, кодирующих ферменты глиоксилатного шунта (изоцитратлиаза) и биосинтеза миколовых кислот, кроме того, возрастает экспрессия генов, продукты которых принимают участие в защите от активных форм кислорода и азота (ahpC и katG). Эти результаты были подтверждены с использованием другой микобактерии – *Msm* методами протеомного анализа (Albeldas et al., 2018; Mishra and Sarkar, 2015).

И, наконец, самая популярная (из-за легкости ее выполнения) модель нерепликативного состояния *Mtb* в условиях постепенного развития гипоксии. Роль постепенного истощения кислорода в пробирке для развития нерепликативного состояния у *Mtb* была впервые продемонстрирована Вэйном, который наблюдал существенное ограничение роста, замеченное при этом условии (Wayne, 1954). Поскольку человеческие гранулемы не имеют признаков эндотелия и кровеносных сосудов и считается, что в них развивается гипоксия (Tsai et al., 2006), модель Вэйна базируется на постепенном истощении кислорода в закрытых культурах *Mtb* для имитации этого состояния. Для этого культуры *Mtb* выращивают в герметичных пробирках с определенным свободным пространством для газообмена (Wayne and Sohaskey, 2001). В процессе роста микобактерий концентрация кислорода постепенно уменьшается и, в конечном итоге, развивается состояние гипоксии. В зависимости от времени пребывания бактерий в таких условиях выделяют две различные фазы их адаптации к истощению кислорода: NRP1 с 1%-м насыщением кислородом и NRP2 с менее чем 0,06%-м насыщением кислородом. Эти фазы коррелируют с репликацией, измеряемой по изменению оптической плотности культуры. В NRP1 скорость деления бактериальных

клеток замедляется и наблюдается увеличение толщины их клеточных стенок, что приводит к снижению скорости увеличения оптической плотности. В NRP2 больше не происходит увеличения оптической плотности культуры, вследствие чего появляются адаптированные к анаэробнозису нерепликативные бактерии. Полученные таким образом микобактерии в фазе NRP2 развивают повышенную чувствительность к метронидазолу, агенту, активному против анаэробных микроорганизмов, в то время как аэробно выращенные культуры не восприимчивы к его действию (Wayne and Sramek, 1994). Хотя метронидазол эффективен в лечении ТБ у кроликов и макаков (Lin et al., 2012; Via et al., 2008), практически отсутствует его эффективность при лечении больных ТБ людей (Carroll et al., 2013).

Кроме того, бактерии в этом неделящемся состоянии становятся нечувствительными к изониазиду, лекарственному средству, действующему против растущих клеток (Bartek et al., 2009; Paramasivan et al., 2005). При анализе транскриптома таких нерепликативных бактерий в модели Вэйна было выявлено, что происходит значительное транскрипционное перепрограммирование во время развития состояния гипоксии (Muttucumaru et al., 2004). Несмотря на то, что при гипоксии подавляется уровень транскрипции многих генов, продукты которых участвуют в центральном метаболизме и синтезе белков, увеличивается интенсивность транскрипции других генных кластеров. Первоначальный ответ на развитие гипоксии связан с активацией Dos – регулона, состоящего приблизительно из 50-ти транскриптов, называемых регулоном выживаемости в покое (Dos) (Voskuil et al., 2004). Этот регулон содержит гены, необходимые для получения энергии из альтернативных источников углерода, таких как метаболизм жирных кислот и глиоксилатный шунт, а также включает гены нитратредуктаз (Voskuil et al., 2003b; Wayne and Lin, 1982). Мутант, неспособный усиливать экспрессию Dos, имел дефекты в поддержании уровней АТФ и НАДН, и его реактивация после выхода из условий гипоксии была существенно замедленной (Leistikow et al., 2010). Белки стресса, такие как альфа-

кристаллин, также активируются в модели Вэйна (Desjardin et al., 2001a). Dos - регулон (Park et al., 2003) зависит от регулятора двухкомпонентной сенсорной системы, DosR (также известного как DevR), который активируется в ответ на гипоксию, а также от оксида азота (NO) и оксида углерода (CO) (Kumar et al., 2007). Был обнаружен второй набор генов, называемый устойчивым ответом на гипоксию, в культурах с более длительной гипоксией - эти гены активируются через несколько дней после Dos - регулона, но затем транскрипция этих генов возвращается к начальному уровню (Rustad et al., 2009a). 230 идентифицированных транскриптов в этом ответе, вероятно, транскрипционно регулируются альтернативными сигма-факторами, связанными со стрессом; они также не зависят от DosR (Rustad et al., 2008b). Точная функция этого набора генов при длительной гипоксии еще не охарактеризована. Хотя модель гипоксии широко используется вследствие простоты ее исполнения, но она подвергается серьезной критике, поскольку не соответствует основным свойствам возбудителя, выявляемым при латентном ТБ, а именно, длительное хранение полученных форм и развитие в клетках устойчивости к рифампицину.

Кроме гипоксии применялись и другие подходы для моделирования нерепликативного состояния возбудителя туберкулеза. Для исследования поведения *Mtb* при различных стрессовых условиях применялись следующие методы: обработка бактерий нетоксичными уровнями NO для моделирования активированных иммунных клеток (Ohno et al., 2003; Voskuil et al., 2003), воздействие на патоген слабокислых условий, которые найдены в некротической ткани (Fisher et al., 2002), и пребывание бактерий в условиях недостатка железа, фосфата, углерода и других питательных веществ, которые могут быть обнаружены в некротическом ядре гранулемы (Betts et al., 2002; Rifat et al., 2009). Чтобы более точно отразить сложную среду хозяина, для изучения поведения *Mtb* были применены комбинации стрессов (Deb et al., 2009; Kim et al., 2008a). Так, Брик с соавторами (Bryk et al., 2008) продемонстрировали образование нерепликативных форм *Mycobacterium*

bovis BCG (Bacille Calmette Guerin), вследствие воздействия NO при слегка кислом значении pH; эти условия воспроизводили среду макрофагальной фагосомы. Другие модели нерепликативного состояния микобактерий демонстрируют те же общие тенденции изменений транскриптома, которые наблюдаются при гипоксии: гены центрального метаболизма подавляются, тогда как индуцируются стрессовые белки и пути альтернативного метаболизма, включая путь биосинтеза триацилглицерина (Daniel et al., 2004). Это сходство, вероятно, связано с DosR, потому что он может быть активирован несколькими стрессовыми сигналами окружающей среды.

Несмотря на то, что все эти модели нерепликативного состояния микобактерий позиционируются как модели покоя, они подлежат серьезной критике относительно истинности получения действительно покоящихся форм, которые потенциально ответственны за развитие латентного ТБ у людей. Так, известный антибиотик - рифампицин, ингибитор РНК-полимеразы, очень активен в отношении бактерий во многих из этих систем покоя *in vitro* (Klinkenberg et al., 2008b; Paramasivan et al., 2005). Это указывает на то, что нерепликативные бактериальные клетки в этих моделях не метаболически инертны, в них продолжают происходить некоторые транскрипционные процессы, скорее всего связанные с синтезом РНК.

Анализируя изменения метаболизма микобактерий в разных стрессовых условиях, описанных выше, можно сделать вывод, что выявленные биохимические изменения (увеличение продукции альфа-кристаллина, включение глиоксилатного шунта), по-видимому, не являются специфическими именно для состояния персистенции, а скорее являются частью общей стратегии выживания микобактерий в неблагоприятных условиях. 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. Возможно, модели нерепликативного

состояния микобактерий (в том числе модель Вейна) являются начальным этапом формирования «некультивируемого» покоящегося состояния *M. tuberculosis*. Брукс с соавт. показали, что метронидазол, оказывающий бактерицидный эффект в отношении микобактерий, полученных в модели Вейна (Wayne and Hayes, 1996), практически не действует на покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, выявленные в мышцах с хронической формой ТБ (Brooks et al., 1999). Этот факт указывает на наличие остаточной метаболической активности в таких формах. В связи с этим их нельзя рассматривать как истинно покоящиеся, а скорее они соответствуют состоянию «выживания при голодании» («starvation survival») (Kaprelyants et al., 1993). Таким образом остается открытым вопрос: являются ли нерепликативные микобактерии, получаемые в условиях модели Вейна, покоящимися?

1.6. Особенности биохимии возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния в условиях стресса.

1.6.1. Регуляция транскрипции генов.

Для нерепликативных бактерий, пребывающих в условиях стресса, описано явление, которому дали название «строгий ответ». В этом случае индуктором этого процесса выступает нуклеотид (p)ppGpp (гуанозин тетра и пентафосфат), запускающий каскад реакций, который приводит к активации транскрипционных процессов в результате чего происходит синтез белков, принимающих участие в ответе на стресс, и в последствии наблюдается снижение активности метаболизма и интенсивности размножения. Активность белков SpoT и RelA влияет на образование (p)ppGpp и его накопление в условиях стресса. В геноме возбудителя ТБ аннотирован только Rv2583c (RelA), являющийся единственной функционально активной синтетазой (p)ppGpp, так как в мутантном штамме *Mtb* с делецией гена этого белка полностью отсутствовал синтез как гуанозин тетрафосфата, так и гуанозин пентафосфата (Primm et al., 2000). Такой мутантный штамм мог

вызывать инфекцию на макрофагах (Primm et al., 2000), но с его использованием оказалось невозможным смоделировать хроническую форму ТБ ни на морских свинках (Klinkenberg et al., 2010), ни на мышах (Dahl et al., 2003), что указывает на важную роль RelA и явления «строгого ответа» для длительного переживания стрессовых условий в организме хозяина. Выявлено, что в *Mtb* этому белку свойственна бифункциональная активность (Sajish et al., 2007). С одной стороны, RelA индуцирует синтез (p)ppGpp при недостатке аминокислот путем аллостерической регуляции макромолекулярного комплекса, который включает в себя рибосому и мРНК с тРНК, и называется Rel – активирующимся комплексом. С другой стороны, RelA способен гидролизовать (p)ppGpp при высокой или достаточной концентрации аминокислот в клетке (Sajish et al., 2007).

Одной из функций (p)ppGpp является регуляция распада и синтеза неорганического полифосфата (Kuroda et al., 1997), который состоит из десятков или сотен фосфатов, соединенных между собой фосфоангидридной связью. В благоприятных условиях полифосфаткиназы (Prk1/Rv2984 и Prk2/Rv3232c) синтезируют полифосфаты из нуклеотидтрифосфатов в то время, как в его гидролизе участвует экзополифосфатаза (Prx/Rv0496). Таким образом, в активной бактерии устанавливается динамическое равновесие между синтезом и распадом полифосфатов (Kornberg et al., 1999). Несмотря на то, что оба гена (*Prk* и *Prx*), контролирующие синтез и распад полифосфатов, лежат в одном опероне и находятся под контролем одного фосфат-зависимого транскрипционного фактора (Kornberg et al., 1999), при неблагоприятных условиях наблюдается тысячекратное увеличение концентрации полифосфата в клетке за счет возрастания уровня экспрессии синтетазы полифосфата и снижения интенсивности транскрипции полифосфат гидролазы (Kornberg et al., 1999). Действительно, в условиях отсутствия гена *ppk* в клетках *Msm* не происходит синтез полифосфата, что приводит к крайней чувствительности таких бактерий к действию окислительного стресса и гипоксии (Sureka et al., 2007). А в случае *Mtb*, в

результате делеции гена *ppk* нарушается синтез *relA* и, как следствие, (p)ppGpp (Sureka et al., 2007, 2008), что указывает на значительную роль полифосфатсинтазы на протекание начальных стадий «строгого ответа». Кроме того, в условиях делеции гена *ppk* обнаружено снижение интенсивности экспрессии генов *mprB* и *sigE*.

Не так давно был найден еще один фермент, участвующий в синтезе полифосфатов - Ppk2/Rv3232c (полифосфаткиназа). В результате делеции гена этого фермента происходит подавление устойчивости бактерий к действию антибиотиков и ухудшается способность бактериальных клеток выживать в условиях макрофага (Chuang et al., 2013). При гиперэкспрессии генов, контролирующих как синтез (*ppk*), так и гидролиз (*ppx*) полифосфатов в *E. coli* происходит снижение жизнеспособности бактерий в обоих случаях (Ault-Riché et al., 1998). В случае *Mtb* высокоспецифичную в отношении полифосфата экзополифосфатазу Ppx кодирует ген *Rv0496* (Choi et al., 2012). В бактериях штамма *Mtb* с делецией этого гена наблюдается внутриклеточное накопление полифосфата, что приводит к замедлению скорости роста бактерий в экспоненциальной фазе развития культуры (Thayil et al., 2011). В случае делеции этого гена у *Msm* наблюдается увеличение экспрессии генов *relA*, *sigE* и *mprB*, что подтверждает участие полифосфатов в синтезе (p)ppGpp благодаря системе *sigE-relA-mprAB* (Sureka et al., 2008). Другими словами, при неблагоприятных условиях роста в качестве источника фосфата двухкомпонентная гистидин-киназная система MrpAB использует полифосфат, при этом происходит фосфолирование регулятора MrpA, который активирует экспрессию гена *sigE*, в результате увеличивается активность транскрипции *relA* и возрастает уровень (p)ppGpp. Было обнаружено, что механизм, при котором реакции «строгого ответа» инициируются полифосфатом, является уникальным для микобактерий, тогда как у других видов бактерий запуск «строгого ответа» связан с активностью RelA (Magnusson et al., 2005).

Транскрипция гена *rpoS* (сигма фактор σ^S / σS), индуцирующего экспрессию свыше семидесяти генов, участвующих в замедлении активности метаболизма и скорости деления клеток в условиях стресса, положительно регулируется полифосфатом (Ault-Riché et al., 1998; Hengge-Aronis, 2002a; Shiba et al., 1997).

Таким образом, реакции «строгого ответа» являются первой стадией при адаптации бактерий к стрессовым условиям окружающей среды, в том числе к условиям организма хозяина, что, в свою очередь, вызывает остановку деления бактерий вследствие замедления скорости метаболизма.

В регуляции уровня транскрипции генов в бактериях в ответ на меняющиеся условия внешней среды огромная роль принадлежит так называемым двухкомпонентным системам. В состав таких систем, как правило, входит сенсорный компонент, представленный протеинкиназой и регуляторная часть в виде транскрипционного фактора, активация которого происходит путем фосфолирования. Таких систем у бактерий достаточно много, в частности, в клетках *Mtb* их двенадцать. За счет них в бактериальной клетке регулируется ряд процессов: кислородное дыхание (SenX3-RegX3), адаптация к условиям макрофага и синтез клеточной стенки (PrrAB), удвоение ДНК (MtrAB) и др. (Parish, 2014). Обычно активация таких систем происходит под действием стрессовых факторов. У микобактерий имеется три основные системы, которые связаны друг с другом и запускаются в результате стресса – DosRS, PhoPR и MprAB.

Как уже упоминалось выше, основная роль в адаптации микобактерий к развитию гипоксии (модель Вейна) принадлежит двухкомпонентной системе DosRS (или DevRS). В клетках *Mtb* активация транскрипционного регулятора DosR происходит путем его фосфорилирования сенсорной гистидин-киназой DosST (Park et al., 2003; Rustad et al., 2008, 2009). Впервые активность этой системы была обнаружена в модели образования нерепликативных микобактерий (предположительно покоящихся) в условиях постепенно развивающейся гипоксии в модели Вейна и получила название – dormancy survival regulator DosR («регулятор выживания в состоянии покоя») (Sherman et

al., 2001). Увеличение транскрипции генов, входящих в DosR регулон было показано не только для условий гипоксии, но и при других стрессовых факторах: в присутствии окиси азота (Kumar et al., 2008), оксида азота (Voskuil et al., 2003a), витамина C (Taneja et al., 2010); а также в условиях макрофага (Schnappinger et al., 2003) и при острой (Karakousis et al., 2004) или хронической (Shi et al., 1993) форме ТБ в мышцах. В состав DosR регулона входит 48 генов, участвующих в адаптационном ответе на развитие гипоксии. В зависимости от функции их разделяют на следующие группы: быстрый стрессовый ответ, транскрипционные регуляторы и сенсорные киназы, метаболизм нуклеиновых кислот, биосинтез клеточной стенки, транспорт и протеазы, метаболизм азота, регуляция окислительно-восстановительного баланса, взаимодействие с организмом хозяина (Peddireddt et al., 2017). Особенное внимание привлекли гены, продукты которых участвуют в получении энергии на основе альтернативных источников углерода, например путем деградации жирных кислот, а также некоторые нитратредуктазы. К таким генам относятся: нитратредуктаза (narX), нитрит/нитрат транспортер (narK2), триглицерид синтетаза (tgs1). Имеется ряд универсальных стрессовых белков, среди которых белок теплового шока (hspX), рибонуклеозид-дифосфат редуктаза (nrdZ), альтернативный переносчик электронов (fdxA) и шесть белков, участвующих в формировании устойчивости ДНК к повреждениям). Некоторые из генов DosR регулона задействованы в механизмах выживания *Mtb* в условиях организма хозяина, что было выявлено путем транскриптомного анализа возбудителя в моделях на животных *in vivo* (Klinkenberg et al., 2008a). Имеются данные, что DosR - зависимый рибосомальный фактор (RafH) связывается с рибосомой, что приводит к ее стабилизации. В условиях гипоксии отсутствие этого гена приводит к потере жизнеспособности мутантного штамма (Trauner et al., 2012).

Поскольку в модели Вейна происходит увеличение экспрессии гена, продуктом которого является изоцитратлиаза (участвующая в глиоксилатном шунте и в метаболизме жирных кислот) (Schubert et al., 2015), а также

подобный эффект наблюдается в моделях хронического ТБ у мышей (McKinney et al., 2000), высказано предположение, что вместо классического цикла Кребса микобактерии используют глиоксилатный шунт в условиях гипоксии. Штамм *Mtb*, в котором был удален ген изоцитратлиазы утратил способность перехода в состояние покоя и отличался пониженной вирулентностью и слабым ростом в организме иммунокомпетентных мышей, но такая мутация не влияла на рост бактерий в период острой фазы инфекции (McKinney et al., 2000). В случае мышей с ослабленным иммунным статусом (мутантные мыши с делецией гамма-интерферона) этот штамм ничем не отличался от штамма дикого типа (Muñoz-Elías and McKinney, 2005). Таким образом, можно предположить, что включение глиоксилатного шунта происходит вследствие пребывания бактерии в условиях выраженного стресса.

В условиях длительной гипоксии происходит индукция активации транскрипции еще одного кластера генов, который назвали «устойчивым ответом при гипоксии» (Chao and Rubin, 2010; Rustad et al., 2008a, 2009b). Этот кластер состоит примерно из 230 генов и включает альтернативные сигма-факторы (*sigE* и *sigH*), являющиеся независимыми от системы *DosR*. По всей вероятности, *DosR* регулон играет важную роль при первичной адаптации микобактерий к условиям развивающейся гипоксии и необходим для перехода к анаэробному типу дыхания.

Исходя из этого, можно предположить, что *DosR* регулон является первичным ответом на действие разных стрессовых условий, в результате чего запускаются начальные процессы (замедление метаболизма и остановка деления), ведущие к образованию покоящихся форм микобактерий. При более глубоких стадиях покоя влияние *DosR* регулона на метаболизм клетки нивелируется.

Второй важной двухкомпонентной системой, активирующейся в ответ на действие неблагоприятных факторов, является *MprAB*. Эта система

индуцирует транскрипцию генов *sigB* и *sigE*, продуктами которых являются сигма-факторы, участвующие в активации механизмов вирулентности и персистенции возбудителя ТБ (Pang et al., 2007; Sureka et al., 2007). Было продемонстрировано, что совместное действие двухкомпонентных систем MprAB и PhoPR приводит к активации ряда генов, участвующих в развитии вирулентности и персистенции микобактерий (Pang et al., 2013; Zhang et al., 2018). В неоптимальных температурных условиях под действием системы MprAB увеличивается уровень транскрипции шаперона альфа-кристаллина (Hsp/Rv2031) (Pang and Howard, 2007), экспрессия которого также регулируется DosR регулоном. Важность системы MprAB в развитии персистенции у *Mtb* подтверждена на модели хронического ТБ у мышей, где наблюдалась потеря инфекционного потенциала для клеток мутантного штамма *Mtb* с делецией гена *mprA*, в то время, как этот штамм был способен заражать макрофаги (Zahrt and Deretic, 2001). Также было показано, что увеличивается уровень транскрипции этого гена в процессе развития хронической туберкулезной инфекции у мышей (Talaat et al., 2007).

Третьей двухкомпонентной системой микобактерий, участвующей в адаптации бактерий к действию неблагоприятных факторов, является PhoPR, которая активируется в условиях низких значений pH и индуцирует экспрессию генов, участвующих в защите бактериальных клеток при окислительном стрессе (García et al., 2018). Не так давно было показано, что PhoPR негативно регулирует систему DosRS (Vashist et al., 2018), что, возможно, указывает на его роль на более поздних стадиях покоя у микобактерий. В тоже время было отмечено, что PhoPR положительно регулирует транскрипционный фактор WhiB3 (Feng et al., 2018). Сенсорный белок WhiB3 имеет в своем составе железо-серный участок, с которым специфически связываются сигнальные молекулы (NO, O₂ и др.), в результате этого запускаются механизмы, регулирующие окислительно-восстановительный баланс в клетке (Singh et al., 2007, 2009). Важность этого

белка в адаптации к условиям организма хозяина была продемонстрирована на мышинных моделях, при этом было обнаружено, что интенсивность экспрессии гена, кодирующего WhiB3 значительно возрастает через две недели после заражения мышей (Banaiee et al., 2006). WhiB3 является положительным транскрипционным регулятором поликетидсинтетаз, что инициирует образование сложных поликетидов и регулирует анаболизм липидов (Pang et al., 2007). В процессе взаимодействия WhiB3 с сигма-фактором SigA усиливается способность бактериальных клеток выживать в условиях организма хозяина (Steyn et al., 2002). Было обнаружено, что при переходе микобактерий в нерепликативное состояние, процессы, индуцируемые WhiB3 связаны с влиянием белков DosR регулона на скорость дыхания бактериальных клеток. В этом случае из-за прекращения переноса электронов в дыхательной цепи вследствие активации DosR в условиях гипоксии, образуется избыток восстановительных эквивалентов, при этом сульфолипиды, триацилглицерол и полиацетилтрегалоза могут служить акцепторами электронов, а поскольку WhiB3 активирует анаболизм триацилглицерола, то таким образом происходит и деструкция лишних восстановительных эквивалентов (Singh et al., 2009). Похожий белок WhiB5, относящийся к тому же семейству, что и WhiB3, принимает участие в процессе адаптации микобактерий к условиям недостатка питательных веществ и выживании клеток при хронической форме ТБ у мышей (Casonato et al., 2012).

Установлено, что токсин – антитоксин (ТА) системы играют значительную роль в поддержании состояния персистенции и покоя микобактерий, поскольку участвуют в регуляции синтеза различных макромолекул. В состав такой системы входит стабильный токсин белковой природы, чаще всего обладающий эндонуклеазной активностью (но бывают токсины и с другим принципом действия), и его специфический «короткоживущий» нейтрализатор – антитоксин. Существует несколько типов таких систем, которые выделили по типу взаимодействия антитоксина с токсином. В ТА

системах 1-го и 3-го типов антитоксин комплементарно взаимодействует с мРНК токсина (Schuster and Bertram, 2013), а антитоксин 5-го типа обладает рибонуклеазной активностью и разрезает мРНК токсина (Wang et al., 2012), вследствие этого транскрипция токсина останавливается. Во 2-м типе ТА систем антитоксин непосредственно связывается с белком-токсином и дезактивирует его (Wang et al., 2012). Описано восемь семейств ТА систем: VarBC, MazEF, HipBA, RelBE, CcdBA, Doc / PhD, HigBA и ParDE (Zhu et al., 2010). В геномах бактерий обычно закодировано несколько копий подобных систем. Так, геном *Mtb* содержит 38 ТА систем (Gerdes et al., 2005), но имеется еще около 80 белков-кандидатов, для которых предполагается наличие подобного рода активности (Ramage et al., 2009). По количеству ТА локусов *Mtb*, по всей видимости, занимает лидирующее положение в бактериальном мире, что, вероятно, дает ему возможность успешно выживать и персистировать в условиях множественного стресса. Было выявлено, что гиперэкспрессия 10-ти ТА локусов из *Mtb* в *E. coli* вызывала остановку роста бактериальных клеток (Gupta, 2009). При гиперэкспрессии трех ТА локусов семейства *rel* из *Mtb* в клетках *Msm* в культурах развивается бактериостаз, обратимый с помощью коэкспрессии соответствующего антитоксина (Gupta, 2009). В клетках *Mtb*, находящихся внутри макрофагов хозяина обнаружена повышенная экспрессия генов *relE*, *relF* и *relK*, входящих в состав ТА систем (Korch et al., 2009).

Наиболее универсальной ТА системой у *Mtb*, активирующейся в условиях разных стрессов (при гипоксии (Betts et al., 2002)), в условиях недостатка питательных веществ (Albrethsen et al., 2013), при инфицировании макрофагов (Korch et al., 2009) является VarBC. Под действием этих стрессов блокируется синтез антитоксина, а стабильный токсин накапливается. Токсин VarC является РНКазой и блокирует трансляцию путем расщепления мРНК (Sharp et al., 2012), что приводит к существенному ингибированию белкового синтеза. Функции ТА систем в бактериальных клетках заключаются в

регуляции транскрипции генов, контроле роста путем ингибирования синтеза белка, развитии множественной устойчивости к антибиотикам (Ahidjo et al., 2011), программируемой гибели клеток (описано выше для MazEF), вирулентности (Agarwal et al., 2018) , развитии устойчивости к условиям стресса и персистенции (Keren et al., 2011). Наличие огромного количества ТА систем в клетках *Mtb* указывает на возможность их использования в ответ на действие сигналов окружающей среды. Так в условиях гипоксии или недостатка питательных веществ инициируется деятельность этих систем вследствие этого происходит «выключение» ряда метаболических путей в бактериальной клетке, и, в конечном итоге запускается процесс перехода в состояние покоя или персистенции. Несмотря на то, что токсины являются белками и могут регулироваться на транскрипционном уровне, их активность определяется прежде всего степенью взаимодействия с их партнерами – антитоксинами. Поскольку в результате действия стрессовых условий (недостатка питательных веществ, действие иммунной системы) наблюдается снижение концентрации «короткоживущих» антитоксинов, это может быть важным фактором, определяющим начало перехода в состояние покоя. Как только неустойчивый антитоксин разрушается, токсин начинает воздействовать на пул мРНК в бактериальной клетке и, таким образом, останавливать метаболизм.

Еще одной важной характеристикой микобактерий, находящихся в нерепликативном состоянии, является 3-х кратное увеличение уровня экспрессии шаперонов, участвующих в процессах рефолдинга белка, поврежденного вследствие действия неблагоприятных факторов. Шапероны, в частности GroEL и DnaK, участвуют в защите белков посредством их связывания и стабилизации (Santra et al., 2018; Susin et al., 2006). Шапероны могут обладать и протеазной активностью. Так Clp разрушает белки, поврежденные в результате действия стрессовых факторов, кроме этого специфически гидролизует основные стрессовые регуляторы (Frees et al., 2014;

Tribble et al., 2007). В условиях стресса в микобактериях увеличивается экспрессия гомолога альфа-кристаллина (Rv2031), являющегося шапероном и проявляющемся при разных видах стресса – недостатке питательных веществ (Mishra and Sarkar, 2015), температурных колебаниях (Yuan et al., 1996), отсутствии железа (Wong et al., 1999). Представленность этого белка увеличивается во всех, описанных выше, моделях нерепликативного покоящегося состояния микобактерий *in vitro* (Qamra et al., 2005).

В нерепликативном состоянии в условиях гипоксии обнаружено увеличение уровня экспрессии генов, белковые продукты которых принимают участие в липидном метаболизме бактериальной клетки. В частности, происходит синтез триглицеридов, которые являются резервуарами потенциальной энергии в период нерепликативного покоя (Low et al., 2009). Увеличение интенсивности транскрипции генов, кодирующих белки синтеза триацилглицеридов было продемонстрировано на разных моделях получения стрессированных нерепликативных микобактерий *in vitro* (Daniel et al., 2004). Запасенные липиды накапливаются в микобактериях в виде гранул (Sirakova et al., 2006) и могут быть использованы как источник энергии в процессе реактивации покоящихся микобактерий (Low et al., 2009). При реактивации покоящихся нерепликативных клеток *M. bovis* BCG в присутствии ингибиторов липаз наблюдалось увеличение количества триацилглицеридов в бактериях и подавление процесса возобновления роста таких микобактерий в благоприятных условиях (Low et al., 2009). Таким образом, накопление триацилглицеридов в покоящихся формах микобактерий может играть значительную роль в механизмах, обеспечивающих поддержание жизнеспособности бактерий в состоянии покоя, а также в их реактивации.

1.6.2. Особенности протеомного профиля микобактерий в моделях нерепликативного состояния *in vitro*.

В процессе анализа протеомного профиля нерепликативных микобактерий, полученных в условиях недостатка питательных веществ (модель Лёбеля) было выявлено изменение количества белков: по одним данным 7 белков (Betts et al., 2002), а по другим - 67 белков (Albrethsen et al., 2013). Среди них было обнаружено уменьшение количества рибосомальных белков и сукцинил-синтетазы, участвующей в цикле Кребса (Albrethsen et al., 2013). Подобный эффект был найден при анализе микобактерий поздней стационарной фазы роста (Ang et al., 2014) и в условиях гипоксии (Kim et al., 2008b). Во всех работах отмечается значительное снижение пролин-богатого белка Rv1860 с неизвестной функцией, в других моделях этот белок не проявлялся в качестве дифференциально экспрессируемого. В условиях недостатка питательных веществ уменьшается количество и разнообразие белков, принимающих участие в процессах биосинтеза многих метаболитов (аминокислот, НАД, ферредоксина и др.). Снижается экспрессия липопротеина поликетидсинтетазы (Rv2934), что указывает на остановку процесса синтеза поликетидных токсинов (Albrethsen et al., 2013).

Несмотря на то, что клетки в этой модели практически лишены каких-либо субстратов, имеется группа белков, экспрессия которых повышается в данных условиях. К ним относятся несколько трансмембранных белков, участвующих в транспорте фосфата, железа, молибдена (Rv1857, Rv3044, Rv0265); а также комплекс АТФ-синтазы (Rv1308-1312), что указывает на активность этих процессов в условиях голодания. Был обнаружен очень важный регулятор транскрипции RelA, который является «спусковым крючком» в запуске каскада реакций «строгого ответа», описанных выше. В условиях недостатка питательных веществ наблюдается значительное увеличение экспрессии ферментов с еноил-коэнзимА-гидратазной активностью, участвующих в синтезе коэнзима А и β -окислении жирных

кислот, что способствует поддержанию минимального энергетического метаболизма голодающей бактериальной клетки. Интересно, что в условиях голодания увеличивается количество ферментов, принимающих участие в синтезе гема - HemC, CysG, HemZ, Rv1314c. Также было выявлено увеличение экспрессии липопротеидов с довольно широким разнообразием функций. Часть из них относятся к группе ABC транспортеров (PstS1, PstS2, FecB, FecB2, ModA), переносящих пептиды через мембрану клетки. Некоторые обнаруженные липопротеины являются сигнальными (LprA and LppH), а некоторые участвуют в процессах деградации белков и углеводов и являются аминопептидазами и гликозидазами (LpqI, LpqL, LpqM). Важной чертой протеомного профиля голодающих микобактерий является повышенная экспрессия белков, входящих в состав ТА-систем. Было выявлено увеличение количества двух антитоксинов и девяти токсинов, относящихся к семействам RelBE, MazEF и VarBC, что приводит к снижению активности трансляционных процессов биосинтеза белков и остановке деления бактериальных клеток (Albrethsen et al., 2013). Увеличение количества токсина VarC (Rv2829c) наблюдается и в условиях других стрессов (например, при гипоксии) (Schubert et al., 2015), что указывает на его особую роль в процессах адаптации микобактерий к неблагоприятным условиям роста.

При изучении особенностей белкового профиля микобактерий, находящихся в длительной стационарной фазе роста было выявлено увеличение количества белка Rv0577 и белка Rv2161 (Ang et al., 2014). Rv0577 относится к факторам вирулентности (Gu et al., 2017), а также участвует в синтезе микотиола и защите от действия антибиотиков и метилглиоксаля (Buchmeier et al., 2003). Rv2161 участвует в биосинтезе ланкомицина, защищающего рРНК от метилирования (Cundliffe, 1989). Отмечается уменьшение количества белков биосинтеза клеточной стенки (Rv0244, Rv1139, Rv3280), антранилат-фосфорибозил-трансферазы Rv2192c, сукцинил-КоА-синтетазы Rv0952 и неизвестного интегрального белка Rv3224 (Ang et al., 2014).

Анализируя белковый профиль микобактерий *M. bovis*, подвергшихся воздействию постепенно развивающейся гипоксии (модель Вейна) Бун с соавторами обнаружили возрастание количества транскрипционного фактора Rv3133, который, как впоследствии выяснилось, регулирует экспрессию генов DosR регулона. В этом же исследовании был выявлен универсальный стрессовый белок Rv2623 и так называемый «белок гипоксии» Hrp/Rv2626 (Boon et al., 2001). Для нерепликативных клеток *Mtb*, находящихся в условиях гипоксии, было продемонстрировано увеличение количества семи белков по сравнению с бактериями логарифмической фазы роста (Rosenkrands et al., 2002). В их числе белок теплового шока шаперон HspX/Rv2031. Увеличение экспрессии этого белка наблюдалось как для *Mtb* при гипоксии (Desjardin et al., 2001b; Sherman et al., 2001), так и для *M. bovis* в этих же условиях (Boon et al., 2001; Cunningham and Spreadbury, 1998; Florczyk et al., 2001), а также при инфицировании макрофагов клетками *Mtb* (Monahan et al., 2001; Yuan et al., 1996). К основным белкам, для которых продемонстрировано увеличение экспрессии в условиях гипоксии, относятся: транскрипционный регулятор DosR регулона Rv3133с; соответственно белки, гены которых входят в состав DosR регулона; «белок гипоксии» Rv2626; универсальный белок стресса UspA/ Rv2623; аланиндегидрогеназа Rv2780; бактериоферритин Rv3841, участвующий в запасании железа (Sherman et al., 2001), а также фермент гликолиза фруктозо-бифосфат-альдолаза Fba/Rv0363 (Rosenkrands et al., 2002). Помимо этого, было выявлено увеличение белков, участвующих в синтезе клеточной стенки: синтетаза циклопропановых жирных кислот/ Rv0503с и β -кетотацил-АСР-синтетаза/ Rv2246 (синтез миколовых кислот), что важно для защиты клеток в условиях окислительного стресса (Starck et al., 2004). Методом высокотехнологичного SWATH MS при анализе абсолютного протеома нерепликативных микобактерий было обнаружено изменение количества 200 белков в условиях гипоксии (Schubert et al., 2015). Этим методом было подтверждено увеличение экспрессии 50-ти белков, принадлежащих DosR регулону, и аланиндегидрогеназы/Rv2780, а также

небольшое уменьшение количества рибосомальных белков. Остальные изменения в экспрессии белков на модели Вейна оказались незначительными (Schubert et al., 2015).

Таким образом, для всех моделей нерепликативного покоящегося состояния микобактерий характерно увеличение количества альфа-кристаллина, входящего в состав DosR регулона. Отмечается снижение скорости дыхания и синтеза АТФ. Однако, между моделями имеется ряд расхождений (например, только в условиях гипоксии обнаружена повышенная экспрессия токсина VarC и неизвестного белка ESAT-6, а также аланиндегидрогеназы), что затрудняет понимание процессов, имеющих место в покоящихся микобактериях в ситуации *in vivo*.

Обобщая имеющиеся знания о протекании туберкулезного процесса в организме человека и об особенностях метаболизма покоящихся микобактерий была предложена следующая модель этого заболевания: клетки *Mtb* попадают в организм хозяина и в них происходит активация генов DosR регулона, а также других генов, продукты которых необходимы для выживания в условиях стресса; при этом микобактерии активно делятся. Среди этой популяции клеток начинают формироваться покоящиеся бактерии вследствие активации ТА – систем, а также других путей, ингибирующих метаболизм. Иммунная система хозяина способна уничтожить активные микобактерии, но покоящиеся клетки персистируют в организме длительный период, что вызывает латентную форму инфекции (Chao and Rubin, 2010).

1.7. Реактивация покоящихся форм бактерий. Роль белков семейства Rpf в реактивации «некультивируемых» бактерий.

Настоящая опасность, которую представляют собой покоящиеся микобактерии, находящиеся в организме хозяина, заключается в их способности переходить в активное состояние (реактивация). В связи с этим,

изучение механизмов и процессов, лежащих в основе этих явлений может привести к разработке новых методов борьбы с патогеном, а также методов диагностики активации латентной формы инфекции. Процесс перехода покоящихся микобактерий в активное состояние является многостадийным, но многие аспекты этого явления до сих пор не ясны. Считается, что этому переходу предшествует специальная стадия – реактивация, при которой осуществляется запуск основных функциональных путей в клетке, что в результате приводит к восстановлению процесса деления клеток, но для начала реактивации необходимо наличие определенных условий (Mukamolova et al., 2003). Более того, трудности, наблюдаемые при реактивации покоящихся бактерий могут быть связаны с наличием разного рода повреждений в длительно стрессированных клетках (например, большого количества окисленных белков) (Nyström, 2001). Избыток питательных компонентов в среде реактивации тоже может оказаться критичным фактором для успешной реактивации, поскольку могут оказаться токсичными. Это явление описано и названо «смерть, ускоряемая субстратом» (Calcott and Postgate, 1972). Было продемонстрировано, что для реактивации покоящихся форм *M. luteus* нельзя использовать мясо-пептидный бульон, являющийся очень обогащенной субстратами средой (Mukamolova et al., 1998). Чаще всего восстановление стрессированных бактерий проводят на достаточно обедненных средах с низким содержанием источника углерода/глицерина. Было обнаружено, что реактивации старой культуры *Mtb* из «некультивируемого» состояния благоприятствует добавление к среде супернатанта, полученного из культуры *Mtb* ранней стационарной фазы (Zhang et al., 2001). В этом супернатанте были выявлены фосфолипиды и специфические пептиды, репарирующие повреждения биологических мембран и ускоряющие рост бактерий.

Часто реактивация бывает успешной на жидких средах, но в тоже время полностью отсутствует на плотных агаризированных средах (Biketov et al., 2000; Shleeva et al., 2002). «Некультивируемость» стрессированных бактерий

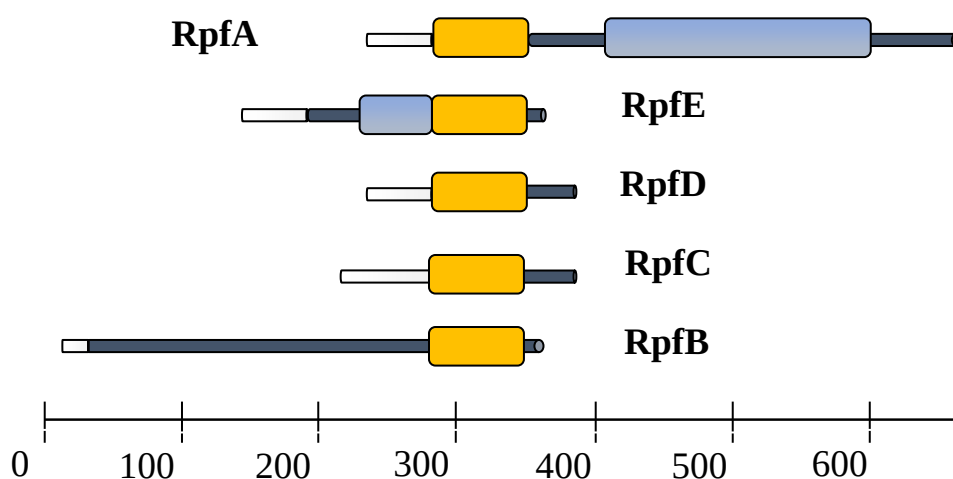
на плотных средах может вызываться несколькими причинами: накопление токсических веществ вследствие несбалансированности метаболизма; поверхностное натяжение; неоптимальные химические и физические условия. Известно, что популяция клеток, подвергшихся действию неблагоприятных условий, гетерогенна и наряду с «некультивируемыми» формами может содержать колониеобразующие клетки, которые могут продуцировать факторы, стимулирующие деление поврежденных бактерий (Pignolo et al., 1994).

Ранее было обнаружено, что *Micrococcus luteus* способен переходить в покоящееся состояние в результате длительного пребывания в стационарной фазе, когда происходит истощение среды по питательным субстратам и накопление токсичных продуктов жизнедеятельности бактерий в закрытой системе. Интересной особенностью таких форм являлась потеря способности к росту на жидких и плотных средах. Однако, при добавлении к среде реактивации супернатанта, полученного из активно растущих культур *M. luteus* происходила индукция размножения таких форм (Mukamolova et al., 1998). В таком активирующем супернатанте был обнаружен белок, способствующий ускоренной реактивации покоящихся клеток *M. luteus* и названный Rpf (Resuscitation promoting factor) (Mukamolova et al., 1998).

Реактивацию микобактерий могут индуцировать экзогенные факторы, которые присутствуют в среде роста (Kana and Mizrahi, 2010). Белок Rpf, секретируемый *Micrococcus luteus*, способен ускорять реактивацию покоящихся «некультивируемых» микобактерий *in vitro* (Shleeve et al., 2004). В микобактериях имеются гомологи этого белка, пять у *Mtb* (Mukamolova et al., 2002a) и четыре у *Msm*. Было продемонстрировано, что рекомбинантный RpfB из микобактерий способен промотировать рост лиофилизированных клеток *M. bovis* (Wu et al., 2008), а также увеличивать количество детектируемых клеток *Mtb* в образцах мокроты больных активным ТБ людей (Mukamolova et al., 2010).

В геноме *Mtb* аннотировано 5 генов, принадлежащих семейству белков Rpf (Рис.1), но, в отличие от микрококка, ни один из этих белков не был существенен для роста *Mtb in vitro* (Kana et al., 2008).

При кристаллографическом анализе структуры консервативного домена белков Rpf было выявлено его сходство со структурой лизоцима. Было продемонстрировано, что Rpf является пептидогликан-гидролазой и способен гидролизовать гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Пептидогликан является важным компонентом и необходим для защиты бактерий в условиях стресса. Изменения в его структуре могут приводить к появлению чувствительности покоящихся бактерий к сигналам внешней среды.



M. tuberculosis

- Каталитический
 - Pro/Ala регион
 - Сигнальная

(Mukamolova et al., 2002b)

Рис. 1. Схема строения белков семейства Rpf из *Mycobacterium tuberculosis*.
Каталитический домен (изображен желтым) консервативен среди всех белков семейства Rpf.

Бактериальные клетки штаммов *Mtb* с одновременной делецией группы генов, кодирующих белки Rpf, отличаются повышенной чувствительностью к детергенту (SDS) и отсутствием способности к реактивации в свежей среде роста *in vitro*, а также к росту в мышах *in vivo* (Kana et al., 2008). Особое внимание исследователей привлек белок RpfB. Было обнаружено, что штамм *Mtb* с делецией гена этого белка отличался дефектным ростом в процессе реактивации аминогуанидином хронической формы ТБ у мышей (Tufariello et al., 2006). В другой работе выявили, что двойная делеция генов *rpfA* и *rpfB* в клетках *Mtb* приводила также к проблемам с реактивацией бактерий этого штамма в модели хронического ТБ на мышах (Russell-Goldman et al., 2008). Такая двойная делеция способствовала дефектному росту *Mtb* в макрофагах мышей, но положительно регулировала синтез цитокинов воспалительного сигналинга (Russell-Goldman et al., 2008). С другой стороны, путем комбинирования различных вариантов делеций генов *rpf* в клетках *Mtb* было обнаружено, что для реактивации наиболее значимы RpfB и RpfE белки, если они делетированы в комплексе с двумя-тремя другими белками этого семейства (Kana et al., 2008).

Было предположено, что реактивация в присутствии белков семейства Rpf может осуществляться с помощью разных процессов. Первая гипотеза основана на процессах, наблюдаемых при прорастании спор *Bacillus anthracis* (Giebel et al., 2009), согласно которым при гидролизе пептидогликана может высвобождаться сигнальная молекула (муропептид), которая может запускать серию реакций, приводящих к делению клетки (Heffron et al., 2010). Вторая гипотеза основывается на изменении структуры пептидогликана в разных местах путем его частичного гидролиза, что может обеспечить транспортные процессы и инициировать некие сенсорные механизмы. Оба эти предположения были сделаны на основании данных, полученных при изучении процесса прорастания спор у рода *Bacillus*. Гидролиз клеточной

стенки имеет большое значение в процессе прорастания спор *B. anthracis*. Так, штамм *B. anthracis* с делецией нескольких гидролаз пептидогликана способен образовывать споры, но процесс их прорастания дефектен (Giebel et al., 2009; Heffron et al., 2010). Подобный эффект наблюдался в мутантных штаммах *Streptomyces coelicolor* с делецией генов пептидогликан-гидролаз (Haiser et al., 2009), где также был продемонстрирован дефектный процесс прорастания спор в отсутствие этих ферментов. Было обнаружено, что фрагменты пептидогликана (муропептиды) могут стимулировать прорастание спор *B. subtilis* (Shah et al., 2008). Муропептиды предположительно способны взаимодействовать с PASTA-доменами серин/треонин киназы PrkC (Jones and Dyson, 2006). Известно, что при прорастании спор активируется PrkC, вследствие этого происходит фосфолирование рибосомных ГТФаз (EF-G), необходимых для запуска процессов трансляции белка в прорастающих спорах. В микобактериях имеется серин/треонин киназа PknB, являющаяся гомологом PrkC и также содержащая внеклеточные PASTA-домены. Благодаря активности PknB происходит фосфорилирование белка Wag31 (гомолога DivIVA), участвующего в морфогенезе во время фазы активного роста бактерий (Kang et al., 2008). Микобактерии способны перестраивать пептидогликан клеточной стенки под воздействием стрессовых условий, что способствует развитию их резистентности к неблагоприятным факторам внешней среды (Lavollay et al., 2008). Соответственно для перехода в активно делящееся состояние необходимы обратные модификации пептидогликана. Возможно, белки семейства Rpf принимают активное участие в этом процессе. Кроме того, было обнаружено, что микобактериальный RpfB взаимодействует с пептидазой RipA, которая важна для нормального роста бактерий (Hett et al., 2007, 2008).

Согласно анализу литературных данных, можно с уверенностью сказать, что неспорообразующие бактерии, в том числе возбудители заболеваний, могут переходить в состояние покоя под действием неблагоприятных

факторов внешней среды. В некоторых случаях покоящиеся формы бактерий характеризуются временной потерей способности расти на плотных средах, т.е. «некультивируемостью», что создает трудности при их выявлении стандартными методами посева. Для перехода «некультивируемых», покоящихся бактерий к нормальному росту необходима процедура реактивации. Имеются только фрагментарные знания о механизмах этого явления, которые пока не дают возможности обрисовать всю картину событий, происходящих в клетке во время реактивации.

Попадая в организм, микобактерии захватываются альвеолярными макрофагами, где подвергаются действию оксида азота, активных форм кислорода, литических ферментов лизосом, низким значениям pH, но даже в этих условиях, микобактериальная клетка способна выжить (Rook et al., 2001). Микобактерии оказались способными выживать в условиях макрофага (Deretic and Fratti, 1999), а также при значениях pH 6.0 – 6.2 (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Поскольку активно делящиеся микобактерии оказались чувствительными к этим значениям pH (Rao et al., 2001), можно предположить, что захваченные макрофагами бактерии способны сохранить свою жизнеспособность благодаря переходу в состояние покоя. Действительно, было обнаружено, что после пребывания клеток *Mtb* в макрофагах, они приобретали «некультивируемый» фенотип и их реактивация происходила только в специальной жидкой среде (Biketov et al., 2000). Этот факт наводит на мысль, что пониженные значения pH могут играть существенную роль в процессах образования покоящихся форм микобактерий. Также важна и скорость воздействия стрессового фактора. Так, было обнаружено, что при переходе микобактерий в нерепликативное состояние в модели Вейна (условия гипоксии), быстрое развитие анаэробноза приводило к гибели большинства микобактериальных клеток, однако при постепенном развитии гипоксии в культуре бактерии переходили в нерепликативное покоящееся состояние, но при этом оставались культивируемыми на стандартных средах (Wayne and Lin, 1982). Аналогично этому можно ожидать образование

покоящихся микобактерий при постепенном снижении значения pH окружающей среды.

На основании выявленных особенностей возбудителя ТБ в период латентной фазы этого заболевания, мы сформулировали основные критерии, которые характерны для *Mtb* в период покоя: 1) отсутствие размножения; 2) низкая активность метаболизма; 3) устойчивость к антибиотикам (в том числе к рифампицину); 4) «некультивируемость» на стандартных плотных средах; 5) способность к длительному хранению в условиях стресса; 6) выраженные изменения морфологии; 7) способность к реактивации. Подобное состояние микобактерий пытаются моделировать *in vitro* в различных стрессовых условиях. Однако, ни одна рассмотренная модель получения покоящихся микобактерий не отражает абсолютной совокупности всех качеств, выявленных у возбудителя латентного ТБ.

Важным аспектом, связанным с пониманием явления латентного туберкулеза, является выявление причин перехода покоящихся микобактерий в активное состояние и вследствие этого активизации латентной формы заболевания. Ранее было продемонстрировано, что активно делящиеся бактерии секретируют в среду роста белок семейства Rpf, промотирующий реактивацию покоящихся клеток и стимулирующий размножение активных (Mukamolova et al., 1998). Анализ литературных данных позволил предположить, что, возможно, гидролиз пептидогликана в результате ферментативного действия белка Rpf является важным процессом в реактивации покоящихся микобактерий (ПМ). Однако, возникает вопрос, как связаны между собой эти явления- реактивация ПМ и гидролиз пептидогликана. В литературе обсуждается два возможных механизма участия белков Rpf в реактивации покоящихся бактерий. С одной стороны в процессе гидролиза пептидогликана могут образовываться муропептиды, способные взаимодействовать с поверхностными рецепторами бактериальных клеток. В частности, в отношении спорообразующих бактерий *B.subtilis* роль муропептидов, как сигнальных молекул была доказана в процессе прорастания

эндоспор (Shah et al., 2008). В этом случае, рецептором для муропептидов являлась серин-треонин протеинкиназа PrkC. Возможно, подобный путь существует и в случае реактивации покоящихся микобактерий. С другой стороны, белок Rpf, предположительно, может изменять структуру клеточной стенки, делая ее более проницаемой для питательных веществ и субстратов. В рамках данного исследования были экспериментально проверены обе гипотезы.

Однако синтез Rpf отсутствует в покоящихся бактериях и для осуществления Rpf-зависимой реактивации необходимо присутствие некоторого количества этих белков. Возможно, этому этапу предшествует активация покоящейся микобактерии с помощью других, более простых индукторов за счет собственных ресурсов клетки, но до сих пор такие факторы не обнаружены. Поскольку основным источником углерода для клеток *Mtb*, находящихся в организме хозяина являются липиды (Miner et al., 2009), поиск факторов реактивации липидной природы представлял определенные перспективы.

В связи с вышесказанным целью данного исследования являлось выявление основных молекулярных механизмов и факторов образования и поддержания покоящихся форм микобактерий, а также механизма реактивации из этого состояния. На основании полученных данных предполагается провести разработку методов иррадикации покоящихся клеток *Mtb* и предложить новые подходы к диагностике латентной формы туберкулезной инфекции.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1. Микробиологические методы.

2.1.1. Выращивание микроорганизмов и состав сред.

В работе были использованы штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 (ATCC 700084) и штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, а также, полученные на их основе мутантные штаммы (Таблица 1). Для проверки выявленных

принципов поведения бактерий в стрессовых условиях был использован штамм *Corynebacterium jeikeium* K411.

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	коллекция
<i>Mtb</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	коллекция
<i>C. jeikeium</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	коллекция
ΔАЦ	Мутант <i>Msm</i> с делетированным геном MSMEG_4279	получен в работе
ΔАЦ + pMindAЦ	штамм ΔАЦ с делетированным геном MSMEG_4279, трансформированный плазмидой pMindAЦ, 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	Плазмида устойчивости к канамицину и гигромицину	Blokpoel <i>et al.</i> , 2005
pAGH	Плазмида устойчивости к канамицину и гигромицину	Mukamolova <i>et al.</i> , 2002
pAGR	Дериват pAGH, несущий ген <i>rpf</i>	Shleeva <i>et al.</i> , 2004
pMindAЦ	штамм <i>Msm</i> , трансформированный плазмидой pMindAЦ, 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

Msm. Клетки *Msm* выращивали в питательной среде (NB) («Himedia», Индия) при 37°C в течение 24 ч с перемешиванием (200 об/мин). Инокулят (1 мл) вносили в 100 мл среды Сотона, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1.4; L-аспарагин – 4.0; цитрат аммония трехвалентного железа – 0.05; цитрат Na – 2.0; $ZnSO_4$ – 0.01 («Sigma Aldrich», США) и глицерин («Panreac», Испания) – 60 мл, pH 6.0, вместо обычного для этой среды pH 7.0. 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 не установится значение pH среды ~ 6.0. Затем культуру переносили в пластиковые фальконы с плотнозакрытой крышкой и хранили без перемешивания, при комнатной температуре, в темноте, в течение нескольких лет.

В некоторых экспериментах вместо среды Сотона использовали разработанную нами среду 2AC, в состав которой входят (г/л): глюкоза – 40; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.125; NaCl – 1.5; $(NH_4)_2SO_4$ – 2.5; KH_2PO_4 – 13.6; гистидин (Sigma) – 0.44; глутаминовая кислота (Sigma) – 4; раствор микроэлементов – 8 мл; Твин-80 – 0.05%; pH довели до 6.0 с помощью NaOH. Раствор микроэлементов (на 1 литр) 1 г ЭДТА, 10 г $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.1 г $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.04 г $CoCl_2 \times 6H_2O$, 0.1 г $MnCl_2 \times 2H_2O$, 0.02 г $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, 0.2 г $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0.02 г $CuSO_4 \times 5H_2O$ и 0.5 г $FeSO_4 \times 7H_2O$, вода. Составляющие раствора микроэлементов были добавлены в этом порядке и доведены до pH 7.5 с помощью NaOH.

Для получения «некультивируемых» форм клетки *Msm* выращивали в течение 72 час на модифицированной среде Hartman's-de Bont (mHdB), содержащей (на 1 литр): 11.8 г $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1.1 г лимонной кислоты, 20 г $(NH_4)_2SO_4$, 30 мл глицерина, 0.05 % твина-80 и 10 мл раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов (на 1 литр) 1 г ЭДТА, 10 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.04 г $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 г $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 0.5 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, вода.

В эту среду вносили 0.5% раствор БСА (Cohn Analog) («Sigma», США) и 0.05% Твин-80 (Shleeva et al., 2004).

Для выращивания штаммов *Msm*, содержащих плазмиды, в среды культивирования вносили гигромицин (50 мкг/мл) или канамицин (20 мкг/мл).

Культуру *Msm* для получения активных форм выращивали на стандартной среде Сотона (Connell, 1994b), содержащей 0.05 % Твина-80, в течение 2 дней при 37 °С на шейкере (220 rpm).

***Mtb*.** Культуру *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 добавлением ростовой добавки ADC (Himedia, Индия) (Connell, 1994b). Эти бактериальные культуры (в концентрации 10^5 – 10^6 клеток на мл) использовали для посева в модифицированную среду Сотона (мСотона) для получения покоящихся форм *Mtb*. Модификация среды Сотона заключалась в замене глицерина на глюкозу, замене Твин-80 на 0.025% тилоксапол и замене ADC на 0.5% БСА («Sigma», США). Начальные значения pH в модифицированных средах составляли 6.0 - 6.2, что отличалось от pH = 7.0 в стандартной среде Сотона. Среду мСотона (200 мл) помещали в колбу объемом 500 мл (3-5 колб на один эксперимент) и инкубировали при 37 °С с перемешиванием (200 rpm) в течение 10 дней для получения активных клеток или 30-45 дней для получения покоящихся клеток. Периодически измеряли значение pH среды и, когда после фазы защелачивания оно вновь 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 mM для предотвращения дальнейшего закисления среды при длительном хранении. Инкубацию продолжали в статических условиях (то есть без перемешивания) в течение 200 сут (и более) после засева при комнатной температуре в темноте. Периодически из разных пробирок отбирали образцы

для оценки жизнеспособности бактерий методами КОЕ и проведения биохимических и микробиологических экспериментов.

C. *jeikeium*. Клетки *Corynebacterium jeikeium* штам K411 первоначально выращивали с использованием богатой среды TSB (Himedia, Индия) с 0.1 % Твин-80, в течение 20 часов, а затем применяли в качестве инокулята (10^5 клеток мл^{-1}) для роста в минимальной среде, разработанной в настоящей работе. Данная среда включала (г/л): глюкоза – 20; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.125; NaCl – 1.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.5; KH_2PO_4 – 13.6; гистидин (Sigma) – 0.44; глутаминовая кислота (Sigma) – 4; раствор микроэлементов – 8 мл; Твин-80 – 0.1 %; pH доводили до 6.0 с помощью NaOH . Раствор микроэлементов (на 1 литр) 1 г ЭДТА, 10 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.04 г $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 г $\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, вода. Составляющие раствора микроэлементов были добавлены в этом порядке и доведены до pH 7.5 с помощью NaOH . Культуру выращивали при 37°C с перемешиванием (200 об. / мин) в течение 10-14 сут, пока не установится значение pH среды ~ 5.5 .

2.1.2. Оценка жизнеспособности клеток.

Суспензию бактериальных клеток последовательно разводили в свежей среде, содержащей 0.05 % Твина-80, и затем по 10 мкл образца в трех повторностях для каждого разведения высевали на агаризованную среду соответствующую среду: питательную brothE (Himedia или LabM) для *M. smegmatis* или среду Сотона с добавлением АДС для *M. tuberculosis*. Инокулированные чашки культивировали при $+ 37^\circ\text{C}$. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) считали через 5 дней после посева для *M. smegmatis* и 22-25 дней после посева для *M. tuberculosis*. Предел обнаружения КОЕ составлял 10 клеток/мл.

2.1.3. Получение супернатантов для восстановления «некультивируемых» форм.

Супернатанты (СН) с реактационной активностью получали из культур *Mtb*, выращенных на немодифицированной среде Сотона с АДС после последовательного субкультивирования, следующим образом. Сначала клетки из исходной культуры (хранящиеся в замороженном виде при -70°C) инокулировали в эту среду (1 мл на 100 мл) до начальной плотности приблизительно 10^5 клеток на мл и инкубировали в течение 6–8 дней с перемешиванием (100 об / мин). Клетки субкультивировали путем переноса 1 мл инокулята в 100 мл свежей среды и культивировали, как указано выше, в течение 7-8 дней. Аликвоты из второй субкультуры (25, 50 или 100 мкл) инокулировали в среде Сотона с добавлением АДС (200 мл) и культуры, выращенные в течение 24 ч при встряхивании, подвергали центрифугированию (12 000 g, 20 мин) и надосадочную жидкость стерилизовали через 0,22 мкм фильтр (Whatman). Объемы полученного таким образом СН (по 50 мл) были заморожены и хранились при -70°C . Образцы СН анализировали на активность, стимулирующую рост *Mtb*, после добавления к популяции клеток, только что инокулированных в немодифицированную среду Сотона (10^5 клеток на мл), в отношении 1: 1 по объему. Активные супернатанты вызывали более чем 10% -ную стимуляцию роста (более 7–8 дней) по сравнению с контрольной культурой (только среда Сотона), как показали измерения OD600 (Biophotometer, Eppendorf). Хранимые СН использовались сразу после оттаивания; они не были заморожены и использованы повторно. Во всех средах содержался 0.05% Твин-80.

2.1.4. Оценка уровня метаболической активности.

Метаболическую активность бактерий оценивали по интенсивности включения радиоактивного [5,6- ^3H]-урацила (1 μCi , 0.02 $\mu\text{моль}$) и L-[U- ^{14}C]-

аспарагина (4 MBq, 0.02 μ моль). Для этого добавляли 1 мкл радиоактивного вещества к 1 мл клеточной суспензии, и инкубировали в течение 4 часов (для *Msm*) или 24 часов (для *Mtb*) при 37°C с перемешиванием, и параллельно при комнатной температуре без перемешивания. 200 мкл культуры, отобранной из каждого образца, вносили в 3 мл холодной 7% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и инкубировали во льду в течение 20 минут. Далее бактериальную суспензию фильтровали через стеклянный фильтр GF/CTM («Whatman», UK), осадок на фильтре промывали 3 мл 7% трихлоруксусной кислоты, затем 3 мл чистого этанола. После высушивания фильтр перемещали в 10 мл сцинтилляционной жидкости (Ultima GoldTM, Perkin Elmer, USA). Радиоактивное излучение регистрировали с помощью счетчика (scintillation counter LS6500, Beckman, USA).

2.1.5. Активность дыхательной цепи.

Активность дыхательной цепи измеряли спектрофотометрически по восстановлению синтетического акцептора электронов DCPIP (2,6-дихлорфенолиндофенола) (OD600), который восстанавливается за счет метахинона при условии активности дыхательной цепи. Реакционная смесь содержала 0.2 μ моль DCPIP, 0.6 μ моль менадиона и 400 мкл клеточной суспензии в фосфатном буфере (pH 7.4).

Потребление кислорода клетками оценивали *in vitro* при 25°C с использованием электрода Кларка при постоянном потенциале 660 мВ. Инкубационная среда содержала 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Анализ потребления кислорода обрабатывали с использованием программного обеспечения Record-4.

2.1.6. Оценка чувствительности к антибиотикам и повышенным температурам.

Один миллилитр суспензии микобактерий разводили в собственном супернатанте для достижения концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Долю антибиотико-устойчивых клеток определяли по соотношению титров КОЕ/мл (для *Msm*) или НВЧК (для *Mtb*) до и после инкубирования клеток с антибиотиком (канамицином, тетрациклином, гигамицином или рифампицином) различной концентрации (20 – 100 мкг/мл). После воздействия антибиотика клетки перед посевом отмывали 50 мМ фосфатным буфером (рН 7.0). Время воздействия антибиотиком составляло 1-14 сут для *Msm* и 6 – 30 сут для *Mtb*.

Термоустойчивость определяли при прямых микроскопических подсчетах числа клеток, сохранивших интактность (отсутствие прокрашивания йодистым пропидием) после прогревания клеточных суспензий (0.5 мл) в термостате при температурах 60 - 80 °С в течение 10 мин. Число устойчивых клеток *Mtb* определяли по реактивации в жидкой среде (НВЧК) в присутствии супернатанта, полученного из культур логарифмической фазы роста.

2.1.7. Наиболее вероятное число клеток (НВЧК).

Подсчет наиболее вероятного числа клеток (НВЧК) (MPN, most probable number) производили в жидкой среде, в пластиковых 48 луночных плашках (Corning). После проведения серии разведений (100 мкл культуры + 900 мкл жидкой среды) плашки инкубировались при 37°С статически (для *Mtb*) или на шейкере (130 rpm) (для *Msm*) в течение 10 дней. После инкубирования лунки плашки, имеющие видимый рост, считались как положительные при подсчете НВЧК, проведенного с использованием стандартных статистических методов (de Man, 1974). Для *Msm* использовалась жидкая среда, состоящая из среды Сотона (рН 7.0) и питательного бульона NB («Himedia», Индия),

смешанных в соотношении 1:1. Для *Mtb* использовали усовершенствованную версию, позволяющую выращивать большее число потенциально живых клеток, что крайне важно в случае покоящихся «некультивируемых» клеток не способных к росту на плотных средах. Среда для подсчета НВЧК для *Mtb* содержала: МПБ, среду Сотона (pH 7.0), среду Мидельбука 7H9 (Himedia, India), RPMI (Thermo Fisher Scientific, USA), разведенных в соотношении (1:1:1:1), с добавлением 0.5% (масс./об.) глицерина, 0.05% (масс./об.) Твин-80, 10% ADC (Himedia, India).

2.1.8. Реактивация «некультивируемых» форм.

Восстановление НК клеток проводили в жидкой среде, а для количественной оценки эффективности реактивации использовали метод НВЧК. Для этого использовали такую же процедуру последовательных разведений культур, как и для оценки колониеобразующих единиц.

M. tuberculosis: из каждого разведения отбирали 200 мкл пробы и добавляли их в пробирки объемом 14 мл, содержащие 2 мл среды Сотона с добавлением АДС. Пять из них содержали активатор реактивации (белок Rpf, цАМФ, олеиновую кислоту или др). В пяти дополнительных пробирках в качестве среды использовали супернатант с добавлением АДС. Супернатант был получен из культуры *Mtb* логарифмической фазы роста (2–4 недели, в зависимости от скорости роста культуры) фильтрованием через 0.22 мкм фильтр (Whatman), и добавлен в количестве 2 мл в каждую пробирку. Таким образом, для каждого разведения использовали 15 пробирок, которые инкубировали при + 37 °C без перемешивания 2 месяца.

M. smegmatis: для активации использовали 48-луночные пластиковые планшеты (“Corning”), содержащие 0.9 мл среды Сотона или 0.9 мл стерильного супернатанта, полученного из логарифмической культуры *Msm*. Некоторые лунки содержали активатор реактивации (Rpf, цАМФ, жирные кислоты, фосфолипиды и т.д.). Во все лунки был добавлен 0.05% дрожжевой

экстракт (LabM). Соответствующие серийные разведения клеток культур (100 мкл) были добавлены в каждую лунку. Затем планшеты инкубировали при 37 °C с перемешиванием 150 оборотов/мин в течение 5-14 дней.

При подсчете количества реактивированных клеток ориентировались на пробирки или лунки с видимым бактериальным ростом. Значение вероятного количества клеток определяли по стандартным статистическим таблицам (de Man, 1975).

Для реактивации в объеме покоящиеся клетки *Msm* или *Mtb* после двукратной отмывки фосфатным буфером (pH 6.0) ресуспендировали в 200 мл реактивирующей среды, содержащей среду Сотона (pH 7.0) и МПБ смешанных в соотношении 1:1, с добавлением 0,025% тилоксапола и 10 % ADC (для *Mtb*). Для того чтобы получить культуру с оптической плотностью OD 600 = 0.3-0.4 клетки разводили средой роста и переносили в колбы на 500 мл. Инкубация проводилась при 37 °C с перемешиванием при 100–120 об/мин, и периодически отбирали пробы для проведения анализа.

2.1.9. Микроскопия.

Фазово-контрастную и эпифлуоресцентную микроскопию бактериальных культур проводили с использованием микроскопа Nikon eclipse Ni-U microscope (Nicon, Japan). Бактериальные клетки обрабатывали: 1) иодидом пропидия (1.5-3 мкМ) для оценки количества мертвых и поврежденных клеток; 2) бромидом этидия (5 мкМ) для визуализации нуклеоида; 3) флуоресцентный краситель Нильский красный (Nile Red) для визуализации липидных включений. Количество (долю) овоидных клеток в популяциях культур *Msm* и *Mtb* считали относительно усредненных результатов прямых микроскопических подсчетов в 10 полях зрения. Фазово-контрастная микроскопия производилась при 1500 кратном увеличении. Эпифлуоресцентная микроскопия производилась в режиме “TRITC channel”

(Ex = 540/25 nm; DM = 565 nm; BA = 605/55 nm). Фотографии сделаны с использованием камеры Nikon DS Qi2 (Japan).

Атомно-силовую микроскопию проводили с использованием микроскопа SmartSPM («АИСТ-НТ», Россия). Препарат клеток наносили на свежесколотую поверхность слюды (6-10 мкл) и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Слюда отмывали от избытка материала погружением на 1 мин в каплю дистиллированной воды, готовый образец высушивали. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы FemtoScan.

Электронная микроскопия. Собранные клетки отмывали от среды и фиксировали в 1,5% (мас. / об.) глутаральдегиде в 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,2) при 4 ° C в течение 1 часа. После трехкратной промывки этим буфером к материалу добавляли 1% раствор OsO₄ в 0,05 М какодилатном буфере при 20 ° C в течение 3 часов. После обезвоживания в возрастающих концентрациях этанола, материал был внедрен в эпоксидную смолу Epon 812 смолу и нарезан на тонкие срезы на ультратоме LKB III (Uppsala, Швеция). Секции были смонтированы на медной сетке, покрытой Formvar и контрастированы в 3% - растворе уранилацетата в 70% этаноле в течение 30 мин и затем окрашены цитратом свинца при 20 ° C в течение 4-5 мин. Тонкие срезы исследовали на электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Токио, Япония), работающем в стандартных условиях при 60 кВ.

2.1.10. Фракционирование морфологически различающихся бактериальных клеток.

Для выделения фракций покоящихся микобактерий 2 мл пост-стационарной культуры микобактерий аккуратно наслаивали на поверхность раствора (8 мл) с линейным градиентом сахарозы 1.4 – 2.2 М, помещенного в стеклянные пробирки объемом 12 мл. Пробирки центрифугировали при 3000g в течение 40 мин, фракции клеток отбирали в стерильные микропробирки,

клетки трижды отмывали от сахарозы и ресуспендировали в 1 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7.0).

2.1.11. Проточная цитометрия.

Для измерения флуоресценции бактериальных клеток использовали PI (пропидий йодид) и систему FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Анализировали распределение клеток в координатах SSC-H ~ FL3 (регистрировалось 10 000 точек со скоростью записи 1000 точек/с). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения FlowJo LLC («Орегон», США).

2.1.12. Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) ингибиторов Rpf.

Определение МИК проводилось на основе протоколов CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Ninth edition. CLSI document M07-A9). Клетки *M. luteus* выращивали до стационарной фазы в богатой среде (NB, Himedia) в течение 48 часов. Культуру трижды промывали стерильной средой с последующими разбавлениями до конечной концентрации бактерий 10^7 клеток/мл. Разбавленные клетки распределяли по 96-луночным планшетах (250 мкл на лунку) и добавляли тестируемые соединения в концентрациях 2,5–100 мкМ. Соответствующее разведение клеток без добавления ингибиторов служило контролем. Кинетику роста *M. luteus* регистрировали в Multiskan Analyzer (Thermo, Финляндия) (фильтр 620 нм; 30°C в течение 24 часов при перемешивании).

Инокулят *Msm* выращивали в концентрированной в 2 раза богатой среде (NB, Himedia) с добавлением 0,05% Твин-80 в течение 16 часов. 10^7 кл/мл распределяли в 96-луночные планшеты (300 мкл на лунку) с добавлением 0,1% Твин-80 и тестируемых соединений, которые вносили в каждую лунку

микропланшета в концентрациях от 2,5 до 100 мкМ. Кинетику роста *Msm* регистрировали с использованием анализатора Multiskan (Thermo, Финляндия) (фильтр 620 нм; 37°C, 28 ч при перемешивании).

Mtb выращивали в течение 8 дней в среде Сотона с добавлением ADC в присутствии 0,05% Твин-80. Клетки инокулировали в 10 мл свежей среды (для достижения концентрации 10^6 кл/мл), содержащейся в 50 мл-х пробирках. Концентрации ингибиторов варьировали в диапазоне 25–100 мкМ. Пробирки инкубировали при 37°C статически; OD600 измеряли периодически (в течение 12 дней) с использованием биофотометра Eppendorf (Германия). Все тесты определения МИК были повторены три раза в разное время.

2.1.13. Определение минимальных бактерицидных концентраций (МБК) полидиаллиламинов.

Штамм *Msm* mc²155 предварительно культивировали в течение 24 ч при 37°C в орбитальном шейкере (200 об / мин) в 20 мл насыщенной среды с бульоном E LabM (NBE), содержащем (на литр) 5 г пептона, 5 г NaCl, 1,5 г пептона и 1,5 г экстракта дрожжей с добавлением 0,05% (об./об.) Твина-80 в колбах объемом 50 мл. Затем бактерии инокулировали в концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ / мл в 15-мл пробирки, содержащие 2 мл среды Сотона (Connell, 1994) с добавлением водных растворов полимеров в различной концентрации. Через 1,5/12/30/48/72 ч инкубации при 37°C и 120 об / мин культуру из каждой пробирки распределяли на затвердевшем в агаре NBE методом посева штрихом и инкубировали при 37°C. Метод посева штрихом рекомендуется, поскольку он позволяет снизить концентрацию полимера/соединения практически до нуля в конце штриха (Министерство здравоохранения, 1968). Жизнеспособность бактерий определяли через 5 дней (присутствие или отсутствие роста бактерий по всему штриху), то есть определяли минимальные бактерицидные (убивающие) концентрации, соответствующие каждому времени обработки. Все эксперименты повторяли не менее четырех

раз. Экспериментальная погрешность определения значений МБК составила 6–7%.

Штамм *Mtb* H37Rv первоначально выращивали в течение 12–15 дней в среде Сотона с 0,05% Твин-80 с добавлением ADC (белок, глюкоза и NaCl) (Connell 1994). Выращенную культуру добавляли в концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ / мл в 15-мл пробирки, содержащие 2 мл той же среды Сотона и водные растворы полимера различной концентрации. После 1,5/12/30/48/72 ч инкубации при 37°C культуру из каждой пробирки распределяли на агаризированной среде Сотона (с ADC) методом посева штрихов и инкубировали при 37°C. Жизнеспособность бактерий определяли через 21 день (наличие или отсутствие роста бактерий). Экспериментальная погрешность определения значений МБК составила 6–7%.

Кроме того, 10 мл культуры с «некультивируемыми» покоящимися клетками *Mtb* (штамм H37Rv), полученными при постепенном подкислении внешней среды, добавляли в 15-мл пробирки, содержащие водные растворы PDAA различной концентрации. Пробирки инкубировали в течение 3 дней при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали в течение 20 мин ($5000 \times g$); клетки промывали реактивирующей средой и инокулировали в концентрации 10^6 – 10^7 кл/мл в 15-мл пробирках, содержащих 1 мл разбавленной в два раза среды Сотона (содержащей 0,6% глицерина, 0,05% Твина-80 и ADC) и 1 мл супернатанта, полученного из активно растущего *Mtb*. Пробирки инкубировали в течение 40–60 дней (до тех пор, пока видимый рост в контрольной пробирке не стабилизировался). Все эксперименты повторяли не менее четырех раз. Экспериментальная погрешность определения значений МБК составила 6–7%.

2.2. Биохимические методы.

2.2.1. Выделение и очистка рекомбинантных белков.

Использовали укороченную форму Rpf из *M. luteus* (**RpfSm**). RpfSm содержал консервативный домен Rpf и дополнительные 20 аминокислот генного продукта, соответствующие следующей аминокислотной последовательности:

ATVDTWDRLEACESNGTWDINTGNGFYGGVQFTLSSWQAVGGEGYPH
QASKAEQIKRAEILQDLQGWGAWPLCSQKLGLTQADADAGDVDATE.

Укороченный ген был амплифицирован с помощью ПЦР из pET-19b-Rpf, с использованием промотора - праймера T7 CGCGAAATTAATACGACTCACTAT и обратного праймера: CGACGGATCCTCACTCGGTGGCGTCACGT (рестрикционный сайт BamH1 подчеркнут). После денатурации в течение 5 минут при 94 ° С образцы подвергали 2 циклам: 30 с при 94 ° С, 30 с при 58 ° С, 60 с при 72 ° С, а затем 2 цикла: 30 с при 94 ° С, 30 с при 56 ° С, 60 с при 72 ° С и 25 циклов: 30 с при 94 ° С, 30 с при 54 ° С, 60 с при 72 ° С, затем 5 мин при 72 ° С. Очищенный продукт ПЦР расщепляли XbaI и BamH1, очищали, лигировали в вектор pET19b и трансформировали в *E. coli* DH5α. Конструкцию, содержащую укороченный ген *rpf* (RpfSm), секвенировали и трансформировали в *E. coli* HSM174 (DE3). RpfSm очищали из 500 мл культур штамма-продуцента *E. coli*, выращенных при 37 ° С в богатой среде (Hi Media), содержащей 100 мкг / мл ампициллина, до оптической плотности OD600 нм 0,65–0,8. После индукции 1 mM IPTG рост продолжался в течение 4 ч при комнатной температуре. Клетки собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут и ресуспендировали в 5 мл буфера, содержащего 20 mM Трис-HCl, 0,5 M NaCl; 5 mM имидазола, pH 8,0 (BB). Биомассу клеток хранили при -20°C в течение месяца. К размороженной клеточной биомассе добавляли ДНК-азу и РНК-азу (10 мкг/мл) в присутствии 10 mM MgSO₄ и добавляли 1x связывающий буфер

(BB) с 8М мочевиной. После разрушения клеточной биомассы ультразвуком (3 - 4 раза по 1 минуте) проводили центрифугирование 10000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4°C, надосадочную жидкость наносили на колонку с иминодиуксусной кислотой, иммобилизованной на сефарозе 6B (Ni-NTA - Sigma) и уравновешенной 1хBB. После нанесения образца колонку промывали 10 объемами 1хBB. Белок получали в 2 этапа: 1 стадия – фолдинг белка на колонке достигается снижением мочевины с 8М до 0 (градиент мочевины) в течение 40 минут; 2 стадия – элюирование белка имидазолом. Белок элюировали 250 мМ имидазолом. Далее проводили диализ белка против 50 мМ цитратного буфера pH6.0 (дважды: в течение 2-х часов и в течение ночи при температуре 4°C).

RpfB_{280–362} очищали из 200 мл штамма-продуцента *E. coli* (устойчивого к канамицину). Чтобы обеспечить максимальную реактивационную активность, исходная концентрация белка составляла не более 100–200 мкг/мл, а индукция IPTG проводилась не более 2 часов.

RipA_{332–472} был получен с использованием штамма-продуцента *E. coli* (устойчивого к ампициллину). Концентрация белка составляла 400–600 мкг/мл.

При получении белков RpfB и RipA не использовали мочевины. Элюирование белков RpfB и RipA проводили в градиенте имидазола (5-500 мМ).

Полученные рекомбинантные белки после диализа фильтровали через фильтр Millex-GV, Millipore 0,22 μm. Хранили белки при 4°C. Чистоту рекомбинантных белков оценивали электрофорезом в 12% полиакриламидном геле и иммуноблоттом с анти-His-Tag антителами, подтверждали методом MALDI. Измерение концентрации белка проводили на спектрофотометре Bio-Drop по соотношению поглощения при 280 и 260 нм, с учетом коэффициента молярной экстинкции.

Измерение концентрации белков проводили на спектрофотометре СФ-2000 по соотношению поглощения при 280 и 260 нм, с учетом коэффициента молярной экстинкции (коэффициент молярной экстинкции рассчитывается на основе аминокислотного состава белка). Чистоту препарата оценивали электрофорезом в 12% полиакриламидном геле и иммуноблоттом, со специфическими антителами.

2.2.2. Определение содержания ионов аммония в клетках и культуральной жидкости.

Определение содержания ионов аммония в клетках и культуральной жидкости проводили методом тонкослойной хроматографии после дансирования клеточных экстрактов и супернатантов, как описано в работе (Ткаченко and Чудинов, 1989).

2.2.3. Электрофорез и иммуноблоттинг клеточных экстрактов, выделенных из культур *M. smegmatis*.

Электрофорез белков проводили по стандартной методике Лэммли (Laemmli, 1970) в двух одинаковых пластинках 12% SDS ПААГ, одну из которых затем окрашивали коллоидным Кумасси G-250, а вторую использовали для иммуноблоттинга в приборе BioRad в буфере ТГЭС (трис-3.2 г/л, глицин-14,4 г/л, SDS – 1 г/л, этанол – 200 мл, дистиллированной водой довести до 1 л). Блоттинг проходил в течение 16 часов при 30 мА при 4°C на мембрану Millipore Nitrocellulose HANU с размером пор 0.45 мкм.

Неспецифическое связывание с мембраной предотвращали проводя инкубацию мембраны в буфере TBS в присутствии 3% БСА при комнатной температуре в течение часа при перемешивании (50 об/мин), после чего мембрану промывали 3 раза TBS. Буфер TBS: 20 mM трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl (20 мл 1 M трис-HCl pH 8.0; 8.7 г NaCl; дистиллированной водой до 1 л); БСА – бычий сывороточный альбумин.

Первичные антитела (кроличьи поликлональные антитела против Rpf: 2 мкл препарата в 10 мл TBS (Mukamolova et al, 2002) инкубировали с мембраной в течение 1-2 часов при перемешивании (50 об/мин), после чего мембрану промывали 3 раза по 5 мин. 10 мл TBS+Твин-80 (0.05%) при перемешивании.

Вторичные антитела (AntiRabbit АТ с щелочной фосфатазой («Sigma»)) использовали в разведении 1:5000 (2 мкл АТ в 10 мл TBS+Твин-80 (0.05%)); АТ инкубировали в течение 1 часа при перемешивании.

Мембрану промывали 3 раза по 5 мин TBS+Твин-80 (0.05%), затем аналогично – TBS, после чего окрашивали 1 мин Fast BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate («Sigma») при комнатной температуре.

2.2.4. Выделение и очистка РНК

Клетки *Msm*, осажденные центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин, 25 °C), инкубировали в течение 1 часа в лизирующем растворе состава: гуанидин изотиоцианат – 5 М, N-лауроилсаркозин натрия – 0,5%, цитрат натрия 25 мМ, 2-меркаптоэтанол – 0,1 М при комнатной температуре. Клетки собирали центрифугированием (4000 g, 10 мин) и к осадку добавляли 1 мл тризола («Invitrogen», Великобритания). Клетки разрушали трижды в течение 30 с при максимальной скорости на гомогенизаторе FastPrep (MP Biomedicals, США) с использованием бус диаметром 0,1 мм из диоксида циркония. Далее бусы осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об/мин и 25 °C, экстрагировали РНК хлороформом, осаждали изопропанолом, отмывали 70% этанолом и растворяли в воде, не содержащей нуклеиновых кислот Nuclease-free water, («Promega», США), с добавлением ингибитора РНКаз – RNAsin RNase Inhibitor («Promega», США). После этого образцы дважды обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-free DNase («Promega», США), инкубируя их в течение 30 мин при 37 °C и очищали, используя набор для выделения РНК SV Total RNA Isolation Kit («Promega», США) согласно прилагаемому протоколу. ДНКазу затем инактивировали нагреванием в

соответствии с протоколом набора. Образцы элюировали 100 мкл воды, не содержащей нуклеиновых кислот Nuclease-free water, («Promega», США), и оценивали концентрацию спектрофотометрически с использованием спектрофотометра BioDrop Touch Duo. РНК осаждали тремя объемами 96% спирта и хранили при -70 °С. Контроль отсутствия ДНК в полученных образцах РНК проводили с помощью ПЦР со специфическими праймерами к гену *rpf C*.

2.2.5. ПЦР в реальном времени

Для синтеза кДНК использовали праймеры для каждого из четырех **Rpf-подобных генов** *Msm*: RpfAF (5'–AAC TGG GCG ATC AAC ACC–3'); RpfBF (5'–TCC GAC ACC ATC GTG TTG– 3'); RpfCF (5'–GTC AAC TGG GAC GCC ATC–3') RpfFF (5'–AAC ATC CGC AAG ACG TTT G–3').

Реакционная смесь для обратной транскрипции (объем 25 мкл) содержала: 2.0 мкг выделенной РНК, 1.5 мкМ соответствующего R-праймера (концентрация 100 мкМ), 1 мМ смеси нуклеотидов («Fermentas», Литва), 40 ед. ингибитора РНКаз («Promega», США), 200 ед. обратной транскриптазы M-MuLV («СибЭнзим») в соответствующем буфере. Использовали воду, не содержащую нуклеиновых кислот Nuclease-free water («Promega», США). Реакцию проводили при 42°C в течении 1 часа и останавливали инкубацией при 70 °С в течение 10 мин.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор фирмы Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix Sample. Репортерную флуоресценцию обеспечивал интеркалирующий краситель SYBR Green. Реакции проводили согласно протоколу Bio-Rad в приборе «MiniOpticon Real-time PCR System» (Bio-Rad). Использовали следующие пары праймеров: RpfAF (5'–AAC TGG GCG ATC AAC ACC–3') и RpfAR (5'–GAC GGC GAT CTG CTC TTC– 3'); RpfBF (5'–TCC GAC ACC ATC GTG TTG– 3') и RpfBR (5'–CCA CCT TGT CGT TTT GCT C– 3'); RpfCF (5'–GTC AAC TGG GAC GCC ATC–3') и RpfCR

(5'-CCA CGT GGA CTG CTT GAA-3'); RpfFF (5'-AAC ATC CGC AAG ACG TTT G-3') и RpfFR (5'-CAG GTG CCC AGG TTG AAC-3').

Протокол проведения ПЦР в реальном времени был следующий:

1. 5 мин 94°C
- 2 30 сек 94°C
- 3 20 сек 60°C
- 4 1 мин. 72°C
- 5 Оценка репортерной флуоресценции
- 6 Шаг с 2 по 5 - 39 раз
- 7 Кривая плавления строилась в интервале 60°C - 94°C, флуоресценция измерялась с шагом 0.2°C.

Статистический анализ данных проводили с использованием теста Стьюдента, принимая достаточным критерий значимости P 0.05.

Для оценки экспрессии **генов синтеза трегалозы** 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 систем ПЦР в реальном времени LightCycler 480 (Roche, Швейцария); условия циклирования были следующими: 95 °C в течение 20 с, 60 °C в течение 20 с, 72 °C в течение 30 с, повтор 40 раз. Количество 16S рРНК в каждом образце использовали в качестве эталона. Использовали следующие геноспецифичные праймеры:

MSMEG_5892R (5' - ATGTGCAGGAAGAAGCCGAT -3')

MSMEG_3954F (5'- ATCGGCATGAGTACGGGAAC - 3')

MSMEG_3954R (5'- TCTCTGGGATCTGCTTCGGA - 3')

MSMEG_4696F (5'- CACGACATCCACCGCTTCAT - 3')

MSMEG_4696R (5'– TAATCCGCCTTCACCAGACG – 3')
MSMEG_3184F (5'– TACCAGAGCACCCCGTCATA – 3')
MSMEG_3184R (5'– CACATCGGGACCTTCACTCC – 3')
MSMEG_3186F (5'– CAGTTCCGAATCCTGGCAGT – 3')
MSMEG_3186R (5'– CAAGCAGATGCGCAACATCA – 3')
MSMEG_6515F (5'– TGAAGAAGCGGTGCCAGTAG – 3')
MSMEG_6515R (5'– GGCGACTTCTACGTCTGGAG – 3')

2.2.6. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Спектры ЯМР в препаратах экстрактов пигмента, предварительно очищенного с использованием метода ТСХ и затем растворенного в дейтерированном метаноле, регистрировали на спектрометре Varian HA-100 D (рабочая частота спектрометра 100 мГц). Для повышения отношения сигнал/шум использовали накопитель спектров C-1024. Все спектры ЯМР снимали при температуре образцов 34°C. Стабилизация резонансных условий осуществляли по сигналу H₂O, присутствующей в небольшом количестве в дейтерированном метаноле. Для калибровки амплитудных интенсивностей пиков в спектрах ЯМР различных образцов использовали один и тот же 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.

Для исследования растворимых метаболитов пять мл водно-метанольного слоя, полученного после хлороформ-метанольной экстракции из клеток *Msm* (см. выше), содержащего около 10 мг/мл органических веществ, сушили и растворяли в 1 мл D₂O. Спектры регистрировали с использованием спектрометра Bruker AM-300 при 100 МГц.

2.2.7. Экстракция растворимых веществ.

Растворимые вещества экстрагировали из клеток в соответствии с процедурой, описанной (Bligh and Dyer, 1959). Один миллилитр хлороформа и 2 мл метанола добавляли к 0.8 г биомассы клеток. Экстракцию проводили в течение 12 ч. при комнатной температуре периодически встряхивая, потом центрифугировали при 5 000 g 15 минут для удаления клеток. После этого добавляли 1 мл воды и 1 мл хлороформа для разделения фаз. Водно-метанольный слой анализировали с помощью ТСХ, ЯМР или ВЭЖХ.

2.2.8. Тонкослойная хроматография

Десять мкл водно-метанольного экстракта клеток наносили тонким слоем на пластины, содержащие F254-силикагель (Sorbfil, Россия). Хроматографию осуществляли с использованием смеси растворителей 1-пропанол: этилацетат: вода (6: 1: 3). Точечная визуализация была сделана смесью 10% H_2SO_4 в этаноле с последующей термической обработкой.

2.2.9. Измерение количества тиолов.

Биомассу клеток осаждали центрифугированием (5 000 g 15 минут), перерастворяли в 20 mM HEPES буфере, pH 7.4 содержащем 10 mM ЭДТА и 50% (масс./об.) ацетонитрила. Для получения экстракта образцы были прогреты при 60 °C в течение 10 минут. 2 мг DTNB растворялись в 3 мл HEPES–ЭДТА буфера, pH 7.4. Реакционная смесь содержала 100 мкл экстракта, 100 мкл раствора DTNB и 700 мкл HEPES–ЭДТА буфера. Тиолы при взаимодействии с DTNB образуют TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid), уровень которых определялся относительно стандартной калибровки, спектрофотометрически при 412 нм.

2.2.10. Измерение внутриклеточных концентраций NADH и NAD⁺

К 100 мг биомассы клеток добавляли 300 мкл 0.2М HCl (для НАД экстракции) или 300 мкл 0.2М NaOH (для НАДН экстракции). Затем экстракты динуклеотидов помещали в термостат на 75°C на 10 минут. После инкубации смеси охлаждались и нейтрализовались соответствующей концентрацией HCl или NaOH. После центрифугирования при 5 000 g 10 мин для удаления от клеток, экстракты динуклеотидов использовали немедленно для анализа по методу Bernofsky and Swan (Bernofsky and Swan, 1973). Реакционная смесь содержала: 0.6 mM MTT, 3.7 mM феназин метасульфата, 3.4 μ M этанола, 0.14 mM трицина (pH 8.0), 5.0 mM ЭДТА (pH 8.0), и 7 ед/мл дрожжевой алкогольдегидрогеназы (АДГ). Дрожжевая АДГ осуществляет превращение NAD⁺ в NADH, окисляя этанол. Восстановление MTT регистрировалось спектрофотометрически при 570 nm (Cary UV/Vis).

2.2.11. Измерение количества цАМФ.

К осадку клеток, полученному после центрифугирования культуры при 13 000 об/мин в течение 5 минут добавляли 1 мл 0.1Н HCl и нагревали при 95 °C в течение 5 минут (для *M. smegmatis*) и в течение 10 минут (для *M. tuberculosis*), а затем немедленно охлаждали во льду. После разморозки охлажденные образцы разрушали на гомогенизаторе FastPrep-24, далее после удаления клеток центрифугированием (5000 об/мин 15 минут) супернатант использовали для измерения уровня цАМФ. Уровень цАМФ измеряли с помощью метода конкурентной ELISA в 96-луночных планках. Белок G (100 мкл) в концентрации 10 мкг/мл в 50 mM PBS pH7,4 вносили в каждую лунку, инкубировали в течении 2-х часов при комнатной температуре. Затем планку промыли 50 mM PBS pH7,4, содержащим 0,05% Triton X-100 (PBST). Перед экспериментом полученные образцы нейтрализовали 2М Na₂CO₃.

В каждую лунку последовательно добавляли 100 мкл кроличьих антител к цАМФ (1:5000), затем конъюгат пероксидазы с цАМФ (1:20000) и 50 мкл

образца. Плашку инкубировали 2 часа с перемешиванием при комнатной температуре. Далее лунки были промыты (как указано выше). После чего в каждую лунку был добавлен свежеприготовленный субстрат, состоящий из 0,4 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в 100 мМ цитратном буфере pH 4,0 с 3мМ H_2O_2 . После 30-40 минут инкубации реакцию останавливали добавлением 100 μl 1М H_2SO_4 . Яркость окрашивания регистрировали на спектрофотометре для плашек Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Austria) при 450 nm.

2.2.12. Измерение уровня АТФ

Осадок клеток, полученный после центрифугирования культуры при 5 000 g в течение 5 минут промывали с помощью фосфатного буфера pH 7.5. После разрушения клеток на гомогенизаторе и центрифугирования для удаления неразрушенных клеток из супернатанта отбирали аликвоту в 10 мкл. К аликвоте добавляли 100 мкл “АТФ реагента” из набора для измерения уровня АТФ (Lumtek, Russia). Люминесценцию измеряли с помощью системы люциферин/люцифераза на хемилюминометре Lum-5773 (Disoft, Russia).

2.2.13. Экстракция пигмента из клеток.

Пигмент экстрагировали из биомассы бактерий по методу Блая и Дайера (Bligh and Dyer, 1959). К влажной биомассе (0.8 г) добавляли 1.0 мл хлороформа и 2.0 мл метанола, клетки перемешивали в течение 2 ч, затем центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин и к надосадочной жидкости добавляли 1.0 мл воды и 1.0 мл хлороформа (для разделения фаз). Слой хлороформа трижды промывали 0.1 М NaCl и затем анализировали методом ВЭЖХ (Аквилон, «Стайер», Россия).

2.2.14. Выделение пигмента из супернатанта.

Культуру покоящихся клеток *Msm* центрифугировали в течение 20 мин при 4°C и 8000 g. К супернатанту добавляли смолу Сефадекс DEAE A25 (3,0 г) и

смесь перемешивали. Через 30 мин сефадексную смолу собирали фильтрацией, промывали деионизированной водой, лиофилизировали и суспендировали в смеси CH_3OH и H_2SO_4 (95: 5). Эту смесь оставляли на 24 ч при комнатной температуре для метилирования. Нерастворимый материал удаляли центрифугированием и раствор нейтрализовали до pH 7,0 насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Красные флуоресцентные продукты трижды экстрагировали хлороформом и объединенный органический слой упаривали, получая смесь метилированных продуктов.

2.2.15. Спектры поглощения и флуоресценции.

Спектры поглощения регистрировали на биоспектрофотометре Cary 300 Varian. Измерения флуоресценции проводили с помощью флуориметра RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 400 нм.

2.2.16. ВЭЖХ анализ трегалозы, глюкозы, порфирина.

Десять мкл водно-метанольного слоя, полученного после хлороформ-метанольной экстракции клеток (см. выше), наносили на колонку Zorbax [размер 4,6 мм × 150 мм (Agilent, США) и регистрировали с помощью ВЭЖХ-хроматографии Aquilon (Россия) оснащенного рефрактометрическим детектором при комнатной температуре. Подвижная фаза представляла собой ацетонитрил: вода (70:30), скорость потока составляла 1 мл в мин. Коммерческие трегалоза и глюкоза были использованы в качестве стандартов.

Хлороформный экстракт, содержащий порфирины, анализировали методом ВЭЖХ; использовали колонку размером 4.6x250 мм с сорбентом Kromasil 100-5 C18 («Akzo Nobel», Швеция); в градиентном режиме с буфером А (30%-ный водный CH_3CN) и буфером В (100% CH_3CN); скорость потока, 1 мл/мин, объем образца 50 мкл. Копропорфирин III и протопорфирин IX (Calbiochem, США) были использованы в качестве стандартов. Длина волны регистрации – 400 нм.

2.2.17. Конфокальная микроскопия.

Изображения овоидов и 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 (UApO N × 100X, NA 1,49, масляная имерсия, Olympus), для возбуждения флуоресценции порфиринов в полосе Сорэ при 405 нм использовался импульсный лазер LDH-P-C-405B (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия), а излучение регистрировалось с использованием отсекающего фильтра 550 нм и полосного фильтра 635/15 нм (Semrock, США) Флуоресценцию регистрировали с помощью лавинного фотодиода (SPAD SPCM-AQR-14, Perkin Elmer, США), используя метод коррелированного счета фотонов (TCSPC) с платой PicoHarp 300 (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия). Для анализа данных использовалось программное обеспечение SymphoTime® (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия). Спектры флуоресценции регистрировали в конфокальном режиме с помощью спектрометра (Andor Shamrock 163 с камерой DU-970, Великобритания) интегрированного с микроскопом MicroTime 200 (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия)

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

Подготовка образцов: 1,5 мкл образца смешивали с 0,5 мкл 2,5-дигидроксибензойной 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).

2.3. Анализ протеомного профиля.

2.3.1. Подготовка образцов для проведения двумерного электрофореза.

Культуру клеток после наращивания биомассы центрифугировали при 7 000 g 15 минут. После осаждения клетки были отмыты несколько раз с помощью буфера, содержащего: 8 г NaCl, 0.2 г KCl, 0.24 г Na₂HPO₄ (pH 7.4). После отмывки клеточный осадок ресуспензировали в растворе 100 mM HEPES буфера (pH 8.0), содержащем коктейль ингибиторов протеиназ (Sigma, USA) и PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride). Клетки были разрушены на гомогенизаторе (MP Biomedicals FastPrep-24) с помощью циркониевых бус 5 раз по 1 минуте для активных клеток и 10 раз для покоящихся. Лизат клеток откручивали при 13 000 об/мин 15 минут при 4°C для удаления бус и неразрушенных клеток. Для получения мембран клеток лизат откручивали на ультрацентрифуге при 100 000 g (Beckman, USA) в течение 2 часов при 4°C. Мембранную фракцию отмывали трижды с помощью HEPES буфера каждый раз осаждая на ультрацентрифуге. Для получения экстракта белков из клеток *Msm* использовался цвиттерионный детергент CHAPS (2% масс./об.). После первой экстракции мембраны отмывались с помощью HEPES буфера трижды и осаждались на ультрацентрифуге. После этого проводили вторую экстракцию с помощью сильного анионного детергента SDS (2% масс./об.). Для *Mtb* первой и единственной являлась экстракция с помощью SDS. Цитозольную фракцию и экстракты из мембран переосаждали с использованием ReadyPrep 2-D cleanup kit (BioRad, USA) для удаления примесей небелковой природы и детергентов. Осадок белков перерастворяли в буфере для проведения изоэлектрофокусирования следующего состава: 8M мочевины, 2M тиомочевины, 10 mM ДТТ, 2 mM TCEP, CHAPS, 1% (масс./об.) Triton X-100, 1% (масс./об.) ASB и 0.4 % (об./об.) амфолиты (pH 3–10).

2.3.2. Определение количества белка

Количественная оценка белка производилась по методу Flores (Flores, 1978). В 180 мкл реакционной смеси содержался бромфеноловый синий (0.0075%), растворенный в растворе 15% этанола и 2.5% ледяной уксусной кислоты. К реакционной смеси добавляли 20 мкл образца. Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при 610 нм.

2.3.3. Двумерный электрофорез

Изоэлектрофокусирование белков в первом направлении представляло собой неравновесный электрофорез в градиенте pH, который создавался с помощью амфолинов в двух рядах pH, 3-9 и 4-6. Изоэлектрофокусирование проводилось в 5% акриламидном геле ($T=0.04$) в стеклянных трубочках длиной 14 см, с внутренним диаметром трубочек 2.4 мм, в камере Tube Cell (Model 175, BioRad, USA) до достижения 3700 вольт/часов. Акриламидный гель содержал 8М мочевины, 2% (об./об.) амфолинов pH 3–10 и 4-6 (1:4), 1% (масс./об.) CHAPS, 1% (масс./об.) Triton X-100, 0.4% (масс./об.) ASB. Непосредственно перед заполнением стеклянных трубок к смеси добавляли персульфат аммония и TEMED (0,036% конечная концентрация). После изоэлектрофокусирования гели извлекались из трубочек и фиксировали в растворе содержащем 0.375 М Tris-HCl, pH 6.8, 2М мочевины, 20% (об./об.) глицерин, 2% (масс./об.) SDS, 2% (масс./об.) DTT, а затем в буфере содержащем 0.375 М Tris-HCl, pH 6.8, 2М мочевины, 20% (об./об.) глицерин, 2% (масс./об.) SDS, 0.01% (масс./об.) бромфеноловый синий в течение 15 минут в каждом. Полученные гели сразу использовали для фракционирования во втором направлении электрофореза.

Второе направление проводили согласно методике O'Farrell (O'Farrell, 1975) в большом формате (20×20 см), в акриламидном геле с толщиной 1.5 мм в трис-глициновом буфере в камере PROTEAN II для вертикального электрофореза (BioRad, USA). Между стеклами наклеивали разделяющий гель,

содержащий 12% акриламид, 1% (масс./об). SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, персульфат аммония и ТЕМЕД (0,036% конечная концентрация). Сверху настилали концентрирующий гель, содержащий 6% акриламид, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 1% (масс./об), SDS, персульфат аммония и ТЕМЕД (0,036% конечная концентрация). Гели полиакриламидного геля с разделенными белками после изоэлектрофокусирования использовали в качестве стартовой зоны на втором направлении и укладывали на концентрирующий гель. Сверху гели, полученные после изоэлектрофокусирования, заливали расплавленным раствором агарозного геля, содержащим 1% агарозу в растворе электродного буфера для электрофореза с добавлением 0,125% бромфенолового синего. Второе направление электрофореза проводили при напряжении 60 мА на одну пластину. Разделение белков прекращали, когда лидирующий краситель доходил до нижнего края разделяющего геля.

Полученные таким способом гели окрашивались с помощью Coomassie CBG-250 (Roti-Blue Carl Roth, Germany), с последующим окрашиванием серебром. Для этого гели помещали в раствор тиосульфата натрия (0,01% масс./об.) на 2 минуты, и после трехкратной отмывки помещали 0.1% (масс./об.) водный раствор нитрата серебра содержащий 0.1% (об./об.) формальдегида на 15 минут. После трехкратной отмывки водой гели проявляли в растворе 4% карбоната натрия, содержащем 1% формальдегида (<https://www.alphalyse.com/wp-content/uploads/2015/09/Silver-staining-protocol.pdf>).

Фотографии гелей были сделаны с использованием геледокументирующей системы Syngene G:BOX Gel & Blot Imaging Systems (Syngene, UK). Фотографии гелей, окрашенных Кумасси были использованы для денситометрического анализа усредняли между двумя техническими повторностями с помощью программы TotalLab TL120 для каждой биологической повторности.

Каждое видимое пятно вырезалось из геля вручную и анализировалось с помощью MALDI-TOF. Данные пептидных последовательностей MS/MS

полученные после анализа MALDI-TOF подверглись поиску в базе данных Mascot Protein Database (MSDB) для идентификации белков. Белки, для которых покрытие пептидной последовательностью, полученной после MALDI-TOF анализа было менее 12% в дальнейшем не рассматривались. Для идентифицированных белков описание было взято с базы данных Tuberculist для белков *Mtb* и с базы данных Smegmalist для белков *Msm*.

2.3.4. Анализ MALDI-TOF

Все образцы геля, полученные после двумерного электрофореза, были гидролизованы с помощью трипсина в 0.05M NH_4HCO_3 с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 5ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5.25мкл 0.5% трифторуксусной кислоты в 50% растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflextreme BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия).

2.4. Определение активности ферментов.

2.4.1. Получение грубого экстракта бактерий.

К образцам, содержащим 100 мг биомассы клеток, добавляли фосфатный буфер pH 7.5 и разрушали на гомогенизаторе FastPrep-24 (6 циклов по 25 сек. каждый). Фрагменты клеток осаждали на центрифуге при 15 000 g 15 минут. Супернатант использовали для измерения энзиматических активностей. Три биологические повторности были сделаны для каждого образца.

2.4.2. Активность трегалазы.

Ферментативную активность трегалазы измеряли путем оценки высвобождающейся глюкозы с использованием глюкозооксидазного метода (Green et al., 1989). Реакционная смесь в каждой лунке содержала: 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,1), 6 мМ $MgCl_2$, 50 мМ трегалозы и различные количества клеточного экстракта. Смесь инкубировали при 37 ° С в течение 5–200 мин и использовали для измерения активности.

2.4.3. Активность алкогольдегидрогеназы.

Специфическую активность алкогольдегидрогеназы измеряли спектрофотометрически при 340 нм по скорости окисления НАДФН (Galamba et al., 2001). Реакционная смесь содержала 0.25 мМ НАДФН растворенных в 0.02М KH_2PO_4/Na_2HPO_4 буфере (pH 7.3), 50 μ М бензальдегида и 0.2 мл экстракта клеток.

2.4.4. Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы.

Активность фермента измерялась спектрофотометрически при 570 nm по восстановлению МТТ с помощью феназин метасульфата. Реакционная смесь содержала 1% (масс./об.) п-октил- β -D-гликозид, 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 7.4), 75 мМ хлорида натрия, 0.01М цианид натрия, 0.5 мМ МТТ, 0.2 мМ PMS (1-метокси-феназин-метосульфат) и 0.2 мл экстракта клеток. Реакция инициировалась добавлением 20 мМ глицерол-3фосфата (Yeh et al., 2005).

2.4.5. Активность глицеролкиназы.

Скорость реакции измеряли в связанной системе с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой. Реакцию измеряли спектрофотометрически при 340 нм, в следующем составе реакционной смеси: карбонат-глициновый буфер (0,3 мМ глицин, содержащий 30 мМ карбонат калия, pH 8,9), 2 мМ АТФ, 0.3 мМ $НАД^+$, 0.5 мМ PEP (фосфоенолпируват), 6.5 мМ $MgSO_4$, 6 мМ глутатиона

в восстановленной форме, 3 мМ глицерина, 3,5 ед/мл лактатдегидрогеназы и 1.6 ед/мл пируваткиназы и 0.2 мл клеточного экстракта. За единицу активности было принято количество, окисляющее 1 микромоль НАДН.

2.4.6. Активность глицеральдегид -3-фосфатдегидрогеназы.

Скорость реакции измеряли спектрофотометрически при 340 нм по восстановлению НАД в реакционной смеси, содержащей 10 мМ натрий-фосфатного буфера (с добавлением 20 мМ арсената натрия), рН 8.5, 0.25 мМ НАД +, 3 мМ DTT и 0,25 μ М D-глицеральдегид-3-фосфата. Реакцию инициировали добавлением 0,2 мл клеточного экстракта.

2.4.7. Активность фосфоглицераткиназы.

Ферментативные активности анализировали по обратной реакции, от 3-фосфоглицерата до 1,3-бисфосфоглицерата. Реакционная смесь содержала: 80 мМ триэтаноламинового буфера (рН 7.6), 8.0 мМ MgSO_4 , 0,25 мМ НАДН, 2.4 мМ АТФ, 12 мМ 3-фосфоглицерата, 50 $\mu\text{г мл}^{-1}$ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и 0.2 мл клеточного экстракта. Реакцию измеряли спектрофотометрически при 366 нм и 25° С (Krietsch and Bucher, 1970).

2.4.8. Активность пируваткиназы

Скорость реакции определяли в связанной системе с лактатдегидрогеназой, спектрофотометрически по поглощению при 340 нм в результате окисления НАДН. Реакцию измеряли в кювете, содержащей 45 мМ имидазольный буфер, содержащий 0.1 М хлорида калия и 0,05 М MgSO_4 (рН 7.6), 1.5 мМ АДФ, 0.22 мМ НАДН, 1.5 мМ фосфоенолпирувата и 5 ед /мл лактатдегидрогеназы. Реакцию инициировали добавлением 0.2 мл клеточного экстракта.

2.4.9. Активность лактатдегидрогеназы (ферментирующей).

Скорость реакции определяли спектрофотометрически по уменьшению поглощения при 340 нм в результате окисления НАДН. Реакционная смесь содержала 0.2 М Трис-HCl (pH 7,3), 0.2 мМ НАДН, 1 мМ пирувата натрия и 0,2 мл клеточного экстракта.

2.4.10. Активность хинон зависимой лактатдегидрогеназы.

Реакцию измеряли спектрофотометрически при 340 нм. Реакционная смесь содержала 100 мМ фосфатного буфера (pH 7.5), 50 μ М DCPIP, 20 мМ L-лактата, 0.2 мл клеточного экстракта (Billig et al., 2017; Molinary and Lara, 1958).

2.4.11. Активность изоцитратлиазы.

Реакцию измеряли спектрофотометрически при 340 нм. Реакционная смесь содержала 30 мМ имидазола (pH 6,8), 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EDTA, 4 мМ фенилгидразина и 1 мМ DL-изоцитрата и 0.2 мл клеточного экстракта.

2.4.12. Активность НАДН оксидазы.

Скорость реакции определяли по уменьшению поглощения при 340 нм в результате окисления NADH. Реакционная смесь содержала 0.2 М Трис-HCl буфера (pH 7.3), 0.2 мМ NADH и 0,2 мл клеточного экстракта.

2.4.13. Муралитическая активность Rpf.

Муралитическая активность белков Rpf оценивалась по гидролизу искусственноого флюорогенного субстрата (аналога клеточной стенки) - 4-метилумбеллиферил- β -d-N,N',N''-ацетилглюкозамина (4-MUF-3-NAG) ("Sigma", Германия). 6 мМ 4-MUF-3-NAG смешивали с белками (1–10 мкг/мл) в 100 мМ лимонно-кислотном натрий-цитратном буфере, pH 6,0 с 0,5 мМ $MgSO_4$ в общем объеме 0,4 мл. Ряд экспериментов проводился в присутствии

соединений НФТ в диапазоне концентраций 0,5–10 мкг/мл. После 3 часов инкубации при 37°C добавляли 2 мл 10 М NaOH и образцы замораживали и хранили при -20°C. Кинетический анализ активности и ингибирования Rpf проводили с использованием диапазона концентраций субстрата от 3 до 24 мкМ и ингибитора (VII) от 0,5 до 10 мкг/мл. 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 использовали в виде раствора ацетонитрила (1 мг / мл).

2.4.14. Измерения тушения флуоресценции RpfB.

Спектры стационарного возбуждения флуоресценции и эмиссии Δ_{DUF} RpfB были записаны при комнатной температуре с использованием флуориметра RF-5301PC (" SHIMADZU ", Япония) в кварцевой кювете с длиной пути 0,361 см с шириной щели 1,5 нм для возбуждения и 3 нм для эмиссионных каналов. Белки (40–50 мкг/мл) растворяли в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Спектры флуоресцентного излучения измеряли при длине волны возбуждения при 280 нм. Измерения тушения флуоресценции были проанализированы с использованием уравнения Стерна-Вольмера (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q[Q], \quad (1)$$

и модифицированная форма уравнения для гетерогенного типа гашения:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

где F_0 и F - относительные интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии гасителя, соответственно, $[Q]$ - концентрация гасителя, а K_q - константа гашения по Штерну-Вольмеру.

2.4.15. Получение пептидогликана (ПГ) и оценка ферментативной активности Rpf.

Для выделения и очистки пептидогликана из микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv выращивали на среде Сотоны (pH 7,0) при 37 ° C до тех пор, пока клетки не достигли поздней логарифмической фазы (~ 8 дней). Клетки собирали центрифугированием (4000 g, в течение 30 минут), трижды промывали 0,9 % NaCl, автоклавировали (121°C, 20 минут) и ресуспендировали в буфере для разрушения (2% масса / объем Triton X-100 в PBS (0.1 М KH_2PO_4 , 0.01 М NaCl, pH 7.4). Бактериальную суспензию механически разрушали с использованием BeadBeater (Biospec Products, США) с циркониевыми бусами в течение 10 циклов (по 0,5 мин каждый). Неразрушенные клетки и бусы удаляли центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут. Разбитые клетки оставляли на ночь в разрушающем буфере для экстракции оставшегося растворимого материала. Затем клетки были тщательно отмыты от детергента. Для удаления ассоциированных белков материал осажденных клеточных стенок пять раз экстрагировали 2% SDS в PBS при 95 ° C в течение 1 часа. Обработанный осадок промывали водой, 80% ацетоном в воде, чистым ацетоном и затем лиофилизировали с получением очищенных клеточных стенок (состоящих из миколовых кислот, арабиногалактана и пептидогликана). Миколовые кислоты удаляли омылением - кипячением с 0,5% KOH в растворе метанол/толуол (1: 1) в течение 96 часов. Нерастворимый остаток собирали центрифугированием (10000 g в течение 5 минут). Осадок дважды промывали метанолом и дважды диэтиловым эфиром перед лиофилизацией. Для удаления арабиногалактана из комплекса арабиногалактан-пептидогликан образец клеточной стенки инкубировали в 0,1 М H_2SO_4 при 37 C в течение 7 дней (Mahapatra et al., 2008). Полученный ПГ промывали пять раз водой и лиофилизировали. Очищенные образцы ПГ хранили при 4°C.

Очищенную фракцию ПГ ($2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) растворяли в 100 мМ свежеприготовленном буферном растворе карбоната натрия (pH 8,5; довели концентрированной HCl). Мечение с помощью FITC (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США; конечная концентрация $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) проводили в темноте в течение 16 ч при комнатной температуре при перемешивании. Меченый ПГ собирали центрифугированием ($13\,000 \text{ g}$, в течение 10 минут) и тщательно промывали для удаления несвязанного красителя. Меченый материал хранили при -20°C в 50 мМ NaH_2PO_4 (pH 6,0). Для оценки гидролитической активности белков меченый ПГ инкубировали с RpfB и RipA, отдельно и в комбинации, в течение разного временного интервала при 37°C . Реакции останавливали нагреванием при 80°C в течение 10–20 мин. Интенсивность флуоресценции собранного супернатанта измеряли при длине волны возбуждения 492 нм и длине волны излучения 515 нм.

Ферментативную активность белка оценивали по уровню высвобождающихся флуоресцентных фрагментов ПГ. Диапазон концентраций ингибиторов Rpf составлял 0,35–35 мкМ.

2.5. Молекулярно-биологические методы.

2.5.1. Гиперэкспрессия Rv2212 в *M. tuberculosis*.

Плазмида для гиперэкспрессии pMindRv2212 была сконструирована следующим образом:

Амплификацию геномной ДНК *Mtb* проводили с использованием следующих праймеров:

Up2212 5'CTGGATCCTCGCTCACGGCGTCCCACCCTA3',

Low2212 5'CAACTAGTTCGCGACGGCGACGGAGGGGGATAG3'.

Сайты рестрикции подчеркнуты. Продукты амплификации сначала клонировали в вектор pGEM-T (Promega), а затем субклонировали в вектор pMind, используя рестрикционные ферменты BamHI и SpeI (Thermo Scientific).

E. coli и *Mtb* были трансформированы вектором pMindRv2212 путем электропорации. После выращивания в селективной среде колонии проверяли с помощью ПЦР, плазмиды из колоний экстрагировали и проверяли секвенированием.

2.5.2. Конструирование экспрессионного вектора pES.

Вектор экспрессии pES, индуцируемый тетрациклином, был создан на основе вектора pKW08-Lx, характеризующегося хорошо регулируемой зависимой от тетрациклина экспрессией (Williams et al., 2010). По существу, сайт множественного клонирования (MCS), полученный из pMind, был клонирован вместо гена lux. Вектор был построен следующим образом: полилинкер pMind был амплифицирован праймерами pMind-782F (5'-GCTACTCTCATCTGACTG-3') и pMind-909R (5'-CAGGGAAGCTTGTGTCA-3') (HindIII-сайт подчеркнут). Полученный продукт ПЦР (144 п.н.) расщепляли ферментами HindIII и BamHI. Полученный фрагмент ДНК (90 п.н.) лигировали в предварительно расщепленный тем же ферментом рестрикции вектор pKW08-Lx, который приводил к конструированию pES01.

2.5.3. Конструирование экспрессионного вектора pES_MSMEG_4535.

Ген трегалазы MSMEG_4535 был амплифицирован из хромосомной ДНК *Msm* mc²155 с использованием праймеров F4535 (5'-TATCTGCAGAAGAGGAGAGCTGCATGGTTCTGCAACAGACCGA-3') и R4535 (5'-CACAAGCTTCGGCCAACAGCAGCCTCACC-3'). Первый включает PstI-сайт (подчеркнутый), искусственный сайт связывания рибосом (курсив) и первые 20 нуклеотидов гена (стартовый кодон ATG показан жирным шрифтом). Второй включает сайт HindIII (подчеркнуто). Полученный продукт ПЦР был клонирован в простой вектор pGEM-T (Promega, США), расщеплен ферментами PstI и HindIII и субклонирован в вектор экспрессии pES, предварительно разрезанный теми же ферментами. Полученная плазида

pES01-4535 была окончательно трансформирована в штамм mc² 155 *Msm* дикого типа путем электропорации.

Используемые ферменты были приобретены у Thermo Fisher Scientific (бывший Fermentas, Литва). Очистку плазмидной ДНК и выделение ДНК из агарозного геля проводили с помощью системы очистки ДНК Wizard Plus SV Minipreps (Promega, США) и системы очистки Wizard SV Gel и PCR (Promega, США) соответственно. Конструкции pES и pES_MSMEG_4535 секвенировали с использованием праймеров pKW4f (5'-CGCTACTCTCATCGTGGAATC-3') и pKW4r (5'-CCTCGAGGTCGACGGTAT-3'). Вставка гена MSMEG_4535 в pGEM-T была проверена и секвенирована стандартными праймерами M13. Центральная область гена MSMEG_4535 была секвенирована с праймерами F4535seq (5'-AGGCCGACGACTTCTTCTC-3') и R4535seq (5'-GGTGGTGCAGCTCTTCCTC-3').

Все процедуры клонирования выполняли в штамме *E. coli* BMH 71-18 mutS (Promega, США). Экспрессия рекомбинантного гена индуцировалась 20 нг/мл тетрациклина гидрохлорида (Acros Organics, США).

2.5.4. Конструирование экспрессионного вектора pMindАЦ, гиперэкспрессирующего аденилатциклазу MSMEG_4279.

Экспрессирующая плазмида pMind-АЦ (индуцируемая тетрациклином) была сконструирована следующим образом. Кодировующую последовательность MSMEG_4279 вместе с 83 нт вверх по течению и 77 нт вниз по течению амплифицировали из геномной ДНК *M. smegmatis* mc2155 с использованием праймеров Up pMind-АЦ CGGATCCTGCAGCAGCTCGTCACTCACCACA (подчеркнут сайт рестрикции для BamHI) и Low pMind-АЦ CACTAGTGCGGGGCAACGACGAGCTGACGGT (подчеркнут сайт рестрикции для SpeI). Продукт амплификации 1252 п.н. сначала был клонирован в вектор pGEM-T (Promega), а затем субклонирован как фрагмент

BamHI-SpeI 1250 п.н. в векторе экспрессии pMind. Клетки *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* трансформировали вектором pMind путем электропорации.

2.5.5. Создание мутантного штамма *M. smegmatis* с делецией гена MSMEG_4279, кодирующего аденилатциклазу.

Для инактивации гена аденилатциклазы MSMEG_4279 мы заменили ок. 900 п.н. кодирующей последовательности с кассетой устойчивости к канамицину, полученной из плазмиды pHP45 Ω-Km. Это было сделано следующим образом. Праймеры Up ΔАЦ / L CGGATCCCGGCCCAGCGCCTTGAGA (подчеркнут сайт рестрикции для BamHI) и Low ΔАЦ / L GAAAGCTTACCGGTTCGAGGTAGGAGATGA (подчеркнут сайт рестрикции для HindIII) были использованы для амплификации 1028 п.н. восходящего сегмента ДНК (U), включая 90 п.н. с 5'-конца кодирующей последовательности. Это было вставлено в вектор pGEM-T Easy (Promega) для получения pGEM-U. Праймеры Up ΔАЦ / R CAAGCTTGCGCGAGGCGCTGGGAGAC (подчеркнут сайт рестрикции для HindIII) и Low ΔАЦ / R GTCTAGAGGTGCATGTTGGCTGCGGGCTTGAT (подчеркнут сайт рестрикции для XbaI) использовали для амплификации нижестоящего сегмента ДНК (D) длиной 1031 п.н., включая 116 п.н. с 3'-конца кодирующей последовательности. Это было вставлено в вектор pGEM-T (Promega) для получения pGEM-D. Вставка в pGEM-U была затем вырезана NotI и SpeI и вставлена в pGEM-D, расщеплена теми же ферментами с получением pGEM-U-D. Кассету устойчивости к канамицину (KmR) плазмиды pHP45 Ω-Km вырезали как фрагмент HindIII 2170 п.н. и лигировали с расщепленным HindIII pGEM-U-D с получением pGEM-U-Km-D. Наконец, делеционная кассета U-Km-D была выделена из этой плазмиды путем расщепления BamHI и XbaI и вставлена в расщепленный BamHI и XbaI pPR27. Эту полученную конструкцию использовали для трансформации *M. smegmatis* mc2155, получая штамм ΔАЦ, в котором центральный сегмент ок. 900 п.н. кодирующей последовательности MSMEG_4279 был заменен маркером KmR.

2.6. Мыши и инфекция.

2.6.1. Заражение мышей.

Мышей инбредных штаммов I / StSnEgYCit (I / St) и C57BL / 6JCit (B6) разводили и содержали в обычных условиях, отличных от SPF, в центрах содержания животных Центрального института туберкулеза (ЦНИИТ, Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями Министерства здравоохранения России № 755 и Управления по обеспечению благополучия лабораторных животных (OLAW) NIH № A5502-11. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*. В начале экспериментов использовали самок мышей в возрасте 8–12 недель. Все экспериментальные процедуры были одобрены комитетом по уходу за животными ЦНИИТ.

Мышей заражали внутривенно 5×10^6 бактерий на мышь в 0,5 мл стерильного PBS. Ни тетрациклин, ни гиромоцин Б не вводились в этих экспериментах. Чтобы оценить количество микобактерий в селезенке и легких, 0,2 мл серийных 10-кратных разведений отдельных гомогенатов цельных органов, полученных от 4 мышей на группу, высевали на агар Dubos, а колонии подсчитывали после 21–23 дней инкубации при 37°C. Были проведены два независимых эксперимента и объединены их результаты. Смертность оценивали еженедельно.

2.6.2. Анализ КОЕ *ex vivo*.

Микобактериальные колонии (N = 50), полученные из гомогенатов легких, анализировали с помощью ПЦР, чтобы подтвердить наличие инсерции гена Rv2212. Амплификацию проводили с использованием специфических праймеров p-Mind:

Up-pMind 5'CCGGGCCCCGAGCAACACG3 '

Low-pMind 5'CCGCAGGCTCGCGTAGGAATCATC3 '

Все полученные продукты имели длину около 1300 п.н., что соответствует размеру вставки гена.

2.7. Фотодинамическая инаktivация микобактерий.

Для экспериментов по инаktivации светом использовали суспензии покоящихся или активных клеток *Msm* с ОП = 0.1, что соответствовало $\sim 10^7$ бактерий в мл. В лунки 96-луночного планшета Nunc («ThermoFisher Scientific», США) вносили по 100 мкл суспензий бактерий. Образцы освещали с помощью лазера LLD10 («ATC Semiconductor Devices», Россия) при 532 нм и 565 нм. Также освещение образцов на разных длинах волн проводили с помощью LC-SpectraX-7 (Lumencor), оснащенного четырьмя светодиодами и интерференционными фильтрами с полосами пропускания: 390 нм, 475 нм, 575 нм и 650 нм. Мощность света на каждой длине волны оценивали с помощью измерителя мощности Newport 2936-с. Плотность мощности света определяли с помощью измерителя мощности 2936-с («Newport», США). Световой пучок коллимировали до диаметра 5 мм, что соответствовало диаметру лунок 96-луночного планшета. Освещали в течение 5, 15, 30 или 60 мин. Температурный контроль осуществлялся с помощью мультиметрического термпарного датчика 80BK типа К («Fluke», Германия) непосредственно в микроячейке до и после освещения, а также в присутствии и без суспензии микобактерий с точностью $\pm 0.2^\circ\text{C}$. Температура была ниже 40°C в лунках в течение всех экспериментов. После освещения образцов десятикратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) высевали на чашки с агаризованным МПБ для определения КОЕ для *Msm*. Инкубацию проводили при 37°C в течение 5 сут для *Msm*. Для выявления жизнеспособных клеток *Mtb* использовали метод НВЧК с применением жидких сред.

2.8. Статистика.

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.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Создание моделей покоящихся форм микобактерий *in vitro*, имитирующих свойства возбудителя ТБ в период латентной формы заболевания.

Для того, чтобы приступить к изучению процессов и механизмов, лежащих в основе перехода микобактерий в состояние покоя и реактивации из него, необходимо было получить покоящиеся микобактерии в достаточном количестве, необходимом для проведения микробиологических и биохимических исследований. Были постулированы основные свойства, характерные для состояния возбудителя ТБ во время латентной фазы заболевания (Lillebaek et al., 2002; Ehlers, 2009): 1) отсутствие размножения; 2) отсутствие или крайне низкая метаболическая активность; 3) устойчивость к антибиотикам (в том числе к рифампицину); 4) «некультивируемость» при высеве на стандартных плотных средах; 5) способность к длительному выживанию в неростовых условиях; 6) выраженные изменения морфологии клетки; 7) способность к реактивации и росту. 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*).

3.1.1. Образование овоидных покоящихся клеток *Mycobacterium smegmatis*.

Хорошо известно, что для роста микобактерий наиболее оптимальны значения pH близкие к нейтральным (Rao et al., 2001). При культивировании клеток *Msm* на жидкой модифицированной среде Сотона с высоким содержанием глицерина (6%) и сниженным значением стартового pH с 7.0 до 6.0, наблюдали интересную динамику в изменении значений pH в процессе развития культуры. Отмечалась довольно продолжительная лаг-фаза (1-2 суток), затем развивался экспоненциальный рост культуры, который сопровождался увеличением pH внешней среды до 7.0-7.5 (Рис.2).

В этот период активного роста культуры происходит активное потребление аспарагина, содержащегося в среде Сотона, в результате этого происходит образование аспартата (благодаря активности аспарагиназы/ MSMEG_3173) и накопление в среде роста ионов аммония, вследствие этого наблюдается увеличение значения pH среды. Накопление ионов аммония как внутри бактерий, так и в супернатанте было подтверждено методом ТСХ (Рис.3).

В процессе дальнейшего инкубирования после достижения культуры состояния стационарной фазы и развитии большого значения оптической плотности за счет метаболизма глицерина в среде роста наблюдалось накопление органических кислот вследствие этого значение pH в среде плавно понижалось до 5.8-5.7 в течение 7-14 суток (Рис.2).

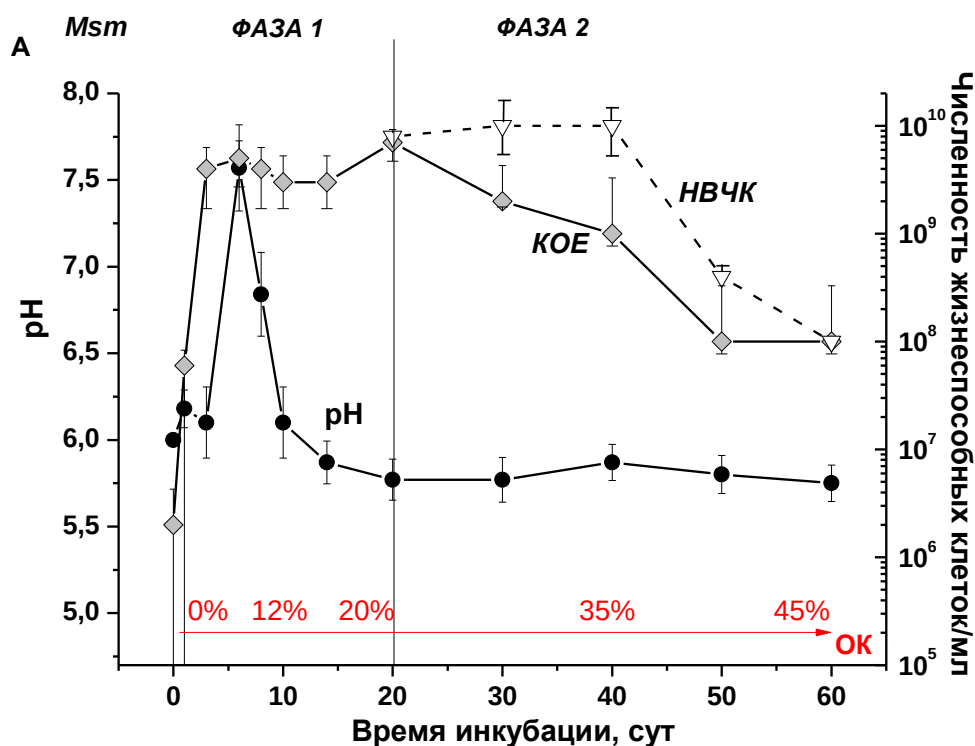


Рис. 2. Оценка изменений величины pH культуры, числа жизнеспособных бактерий (NBЧК и КОЕ) и процентного количества ОК в популяции *M. smegmatis* при инкубировании в среде Сотона с начальным pH 6.0. Шкала ОК – увеличение количества клеток овоидной формы (ОК – овоидные клетки). Фаза 1 – инкубация на качалке при 37°C, Фаза 2 – инкубация при комнатной температуре без качания. NBЧК – реактивация бактерий в жидкой среде; Представлены средние значения данных пяти экспериментов. Приведены среднеквадратичные отклонения.

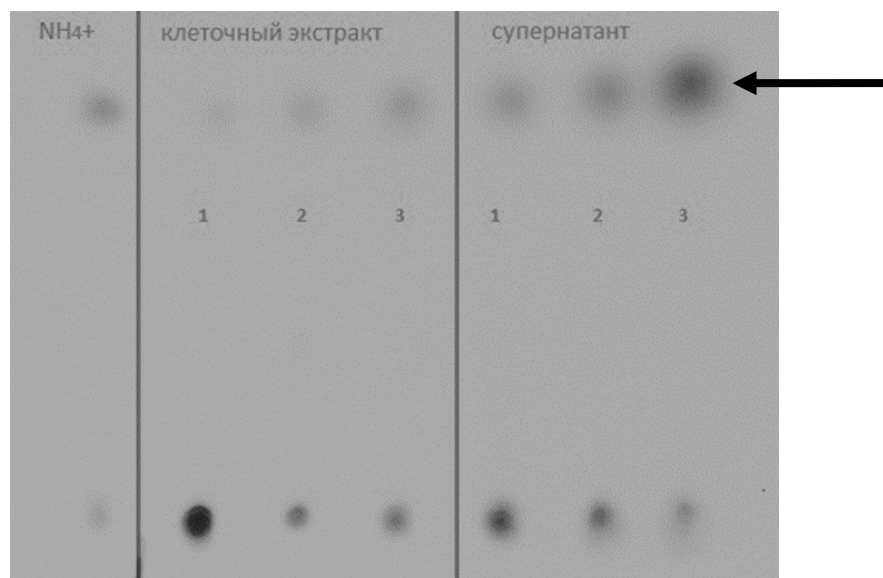


Рис. 3. Тонкослойная хроматография дансированных экстрактов клеток *M. smegmatis* и супернатантов культур, растущих на среде Сотона с начальным pH 6.0: 1 - культура логарифмической фазы роста (2 суток), 2 – культура длительной стационарной фазы роста (20 суток), 3 - культура, содержащая клетки *Msm* овоидной формы (60 суток). Наносили по 2 мкл их проб, полученных из культур, содержащих 10⁸ КОЕ/мл. Стрелкой указано положение иона NH₄⁺.

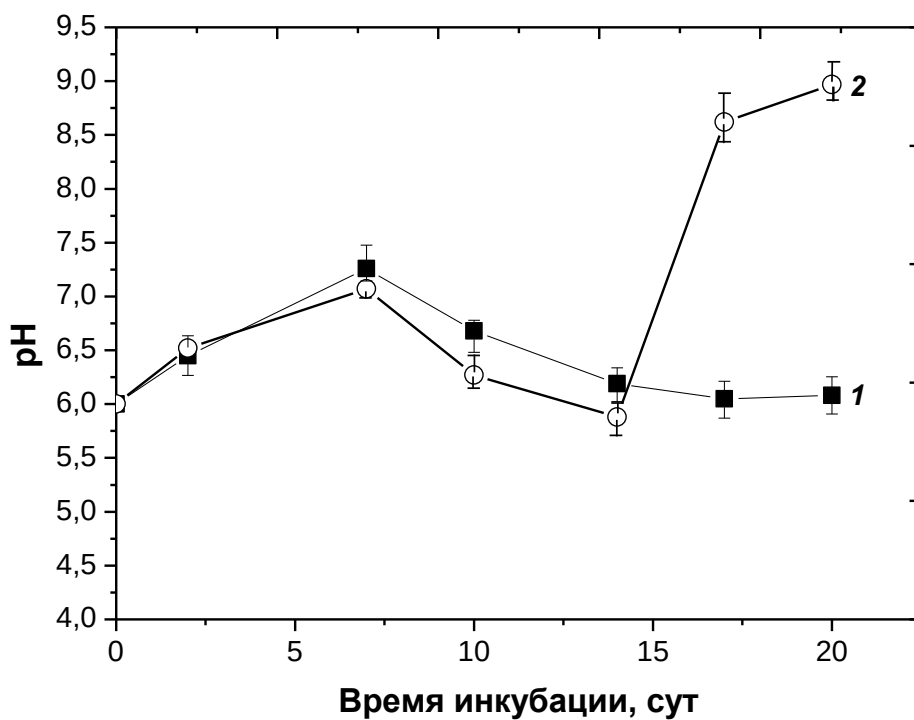
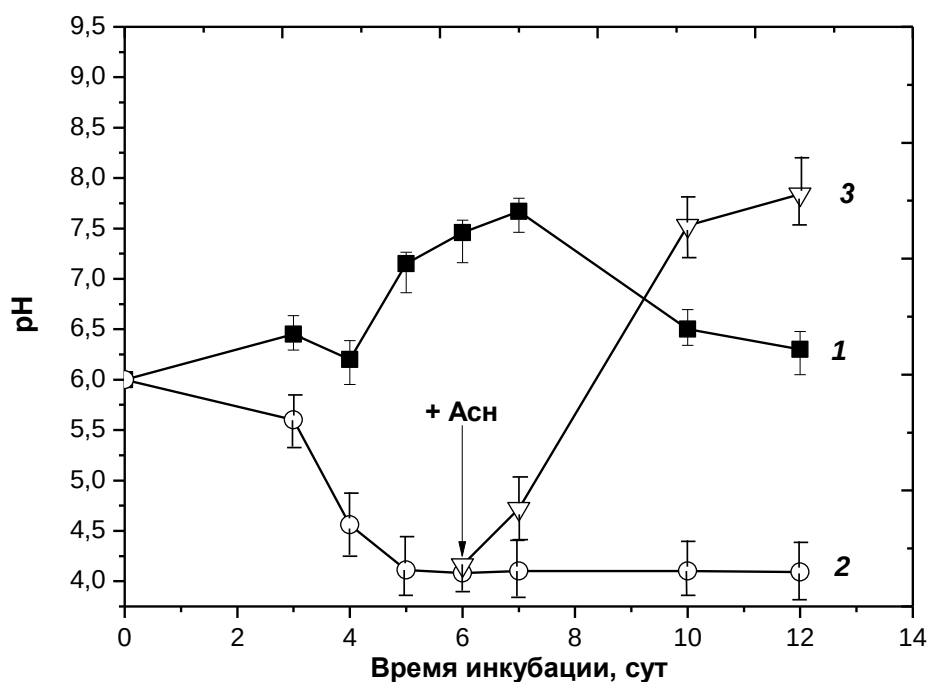
Если аспарагин в среде заменить на сульфат аммония, то в период активного роста значение pH среды понижалось вследствие утилизации аммония бактериями и накопления ионов сульфата в среде. После введения аспарагина в такую культуру (6 суток), значение pH среды резко возрастало (Рис. 4а), что подтверждает связь метаболизма аспарагина с увеличением значения pH среды во время логарифмического роста *Msm*. Последующее снижение pH среды в стационарной фазе развития культуры связано с активной утилизацией глицерина микобактериями, в то время как потребление аспарагина замедляется. Так, при недостатке глицерина в среде роста (Рис. 4б), значение pH резко повышалось (14 суток) после его исчерпания в среде.

Замена глицерина на глюкозу приводила к сходной динамике снижения значения pH в стационарной фазе развития культуры. Было предположено, что закисление среды связано с накоплением некоторых метаболитов в среде роста, например, органических кислот. В процессе ВЭЖХ анализа культуральной жидкости со сниженным значением pH, было обнаружено накопление кислот цикла Кребса, а также лактата, ацетата и пирувата в достаточных для закисления всего объема среды количествах.

Одновременно с развитием сниженных значений pH среды в пост-стационарной фазе (7-9 суток) наблюдалось появление морфологически измененных клеток *Msm*. Эти бактериальные клетки характеризовались овоидной формой, утолщенной слоистой клеточной стенкой и электронноплотной цитоплазмой (Рис.5). Подобные формы *Mtb* с овоидной и коккоидной морфологией ранее были изолированы Хоменко с соавтр. из инфицированных тканей животных (Khomenko, 1984). Согласно данным атомно-силовой микроскопии (Рис. 5ж, 5з), размеры активно размножающихся клеток соответствовали 3.7×0.8 мкм, что существенно отличалось от размеров бактерий с измененной морфологией - 1.2×0.9 мкм. Через 12-14 суток значение pH среды составляло примерно 5.8 и больше не менялось в течение длительного времени (свыше 8-ми месяцев) при хранении

культуры в статических условиях без доступа кислорода при комнатной температуре (Рис.2).

А



Б

Рис. 4. Влияние состава среды на динамику изменения значения pH в период роста культуры *M. smegmatis*. (А) Состав среды: 1- 6% глицерина и аспарагин; 2 - 6% глицерина и сульфат аммония; 3 - 6% глицерина и сульфат аммония, через 6 суток культивирования добавлен аспарагин (Асп). (Б) Состав среды: 1- 6% глицерина и аспарагин; 2 - 2% глицерина и аспарагин.

К моменту достижения минимальных значений pH в культуре *Msm* наблюдалось присутствие трех морфотипов клеток: 40 % палочковидных клеток, 30% переходных форм, 35 % клеток с овоидной формой (Рис. 5).

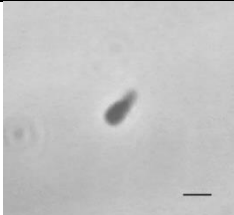
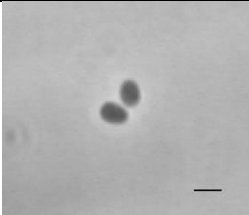
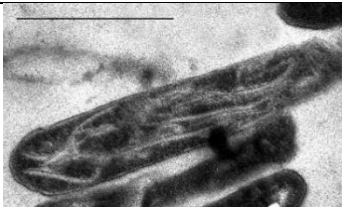
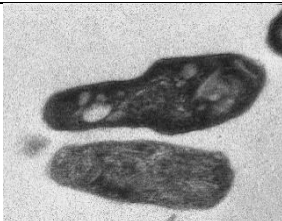
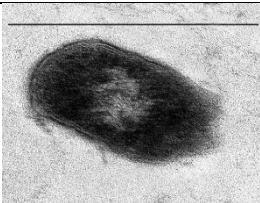
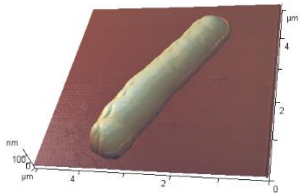
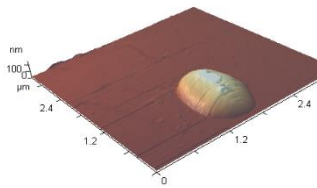
	Клетки логарифмической фазы роста (1)	Переходные формы бактерий (2)	Овоидные формы <i>Msm</i> (3)
Фазово-контрастная микроскопия Длина масштабно й метки <u>2 мкм</u>	 (а)	 (б)	 (в)
Электронная микроскопия Длина масштабно й метки - <u>2 мкм</u>	 (г)	 (д)	 (е)
Атомно-силовая микроскопия	 (ж)		 (з)

Рис. 5. Фазово-контрастная микроскопия (а, б, в), электронная микроскопия (г, д, е) и атомно-силовая микроскопия (ж, з) *M. smegmatis*. Культуры *Msm* выращивали в среде Сотона с начальным pH 6.0: 1 – клетки логарифмической фазы роста (2 суток культивирования), 2 – переходные формы бактерий (20 суток), 3 – овоидные клетки *Msm* (60 сут). Длина масштабной метки: (а–д) – 2 мкм; е – 5 мкм.

В процессе дальнейшего хранения полученной культуры при pH 5.8 в течение 30 суток без перемешивания (статические условия) при комнатной температуре количество клеток с овоидной формой возрастало до 60-70 %, вероятно, в результате трансформации переходных форм.

Таблица 2. Влияние степени снижения значений pH среды на формирование клеток *M. smegmatis* с овоидной морфологией в стационарной фазе роста культуры.

Модификация среды роста*	ΔpH^{**}	Доля ОК***	Доля переходных форм бактерий***
Среда Сотона, pH 6.0	2.2	45	25
Среда Сотона, pH 6.0 + MOPS 50 мМ	0.5	5	0
Среда Сотона, pH 6.0 + MOPS 25 мМ	1.0	15	5
Среда Сотона, pH 6.0 + MOPS 10 мМ	1.5	30	10
Среда Сотона, pH 6.0 + MES 10 мМ	2.0	35	30
Среда Сотона, pH 7.0	1.2	10-15	5
Среда Сотона, pH 7.0 + MOPS 50 мМ	0.4	3	0

* Для снижения уровня закисления среды буфер вводили в среду Сотона после 7 суток инкубирования, когда значение pH среды соответствовало 7.5.

** ΔpH - разница между минимальным значением (14 суток) и максимальным значением pH среды (7 суток).

*** Для покоящихся клеток по результатам прямых микроскопических подсчетов: ОК и переходных форм бактерий, предшествующих овоидным формам. Относительная ошибка 5%.

Для выяснения зависимости между образованием клеток *Msm* с овоидной формой и скоростью развития слабокислых значений pH в культуре, а также с уровнем закисления, на разных стадиях развития культуры вносили буфер MOPS или MES (20-50 мМ, pH 7.5). Эта манипуляция обеспечивала меньшее снижение значение pH культуры, а также более резкое изменение величины pH на 0.5-2 единицы в стационарной фазе (Таблица 2). При обычных условиях получения овоидных форм *Msm* на среде Сотона со стартовым значением pH 6.0 (S6) значение pH снизилось на 2.2 единицы в стационарной фазе развития

культуры и количество целевых форм к 14 суткам культивирования составило 45%, а переходных – 25%.

Было выявлено, что глубина снижения значения pH (Δ pH) культуры влияла на количество образованных овоидных форм бактерий. Высокое число измененных клеток *Msm* (35 % овоидных форм и 30% переходных форм) было получено при плавном снижении значения pH в культуре в присутствии 10 mM буфера MES. На стандартной среде Сотона с исходным значением pH 7.0 (S7) количество клеток овоидной формы к 14 суткам инкубирования было достаточно низким и составило всего 10-15%, а значение pH в стационарной фазе уменьшалось всего на 1.2 единицы. При стабилизации уровня pH путем внесения MOPS (50 mM) и снижении Δ pH до 0.4 наблюдалось практически полное отсутствие клеток с овоидной морфологией (Таблица 2).

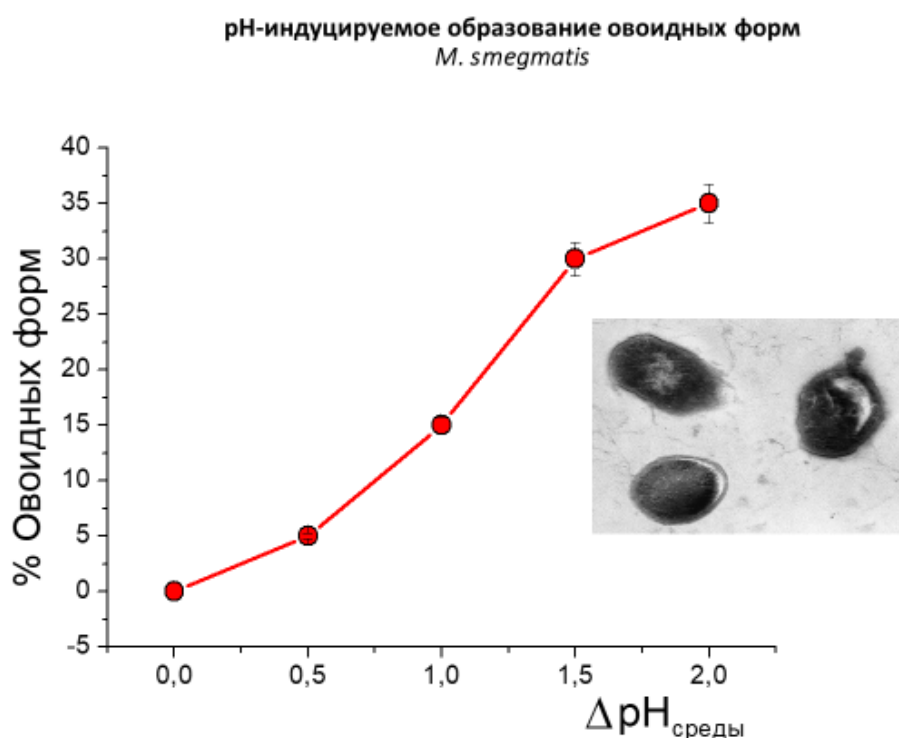


Рис.6. Зависимость количества образованных овоидных форм *M. smegmatis* от разницы значений pH в стационарной фазе развития культуры.

Если значение pH среды в стационарной фазе роста культуры (7 суток) резко понизить на 2 единицы путем внесения в систему буфера MES (50 mM, pH 3.5), то образование морфологически измененных форм не наблюдалось вовсе к 14-м

суткам инкубации, а при дальнейшем инкубировании наблюдался активный лизис культуры (Рис.7).

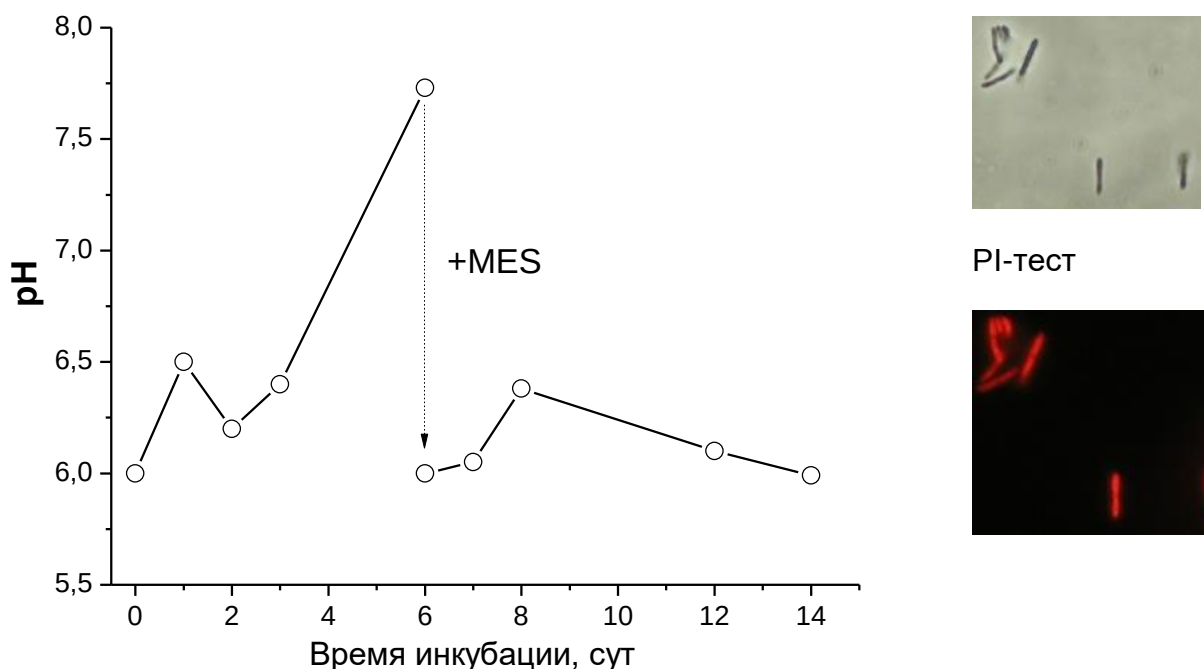


Рис. 7. При резком понижении значения pH в стационарной фазе роста *M. smegmatis* не образуются овоидные клетки. После 6 суток культивирования для понижения значения pH с 7.7. до 6.0 в среду был введен буфер MES (50 мМ, pH 3.5). Через 8 суток после снижения pH был проведен тест с иодидом пропидиума (PI).

Кроме того, значение стартового pH среды тоже влияло на количественный выход овоидных клеток *Msm*, образуемых при постепенном закислении среды в стационарной фазе. Так, было обнаружено, что наилучшим вариантов является стартовая величина pH 5.5-6.2. При более низких значениях pH клетки *Msm* не могли начать рост в этих условиях. При более высоких величинах pH (7.0-9.0) наблюдалась агрегация клеток и сильно выраженная гетерогенность культуры, а также развитие криптического роста в стационарной фазе и вследствие этого повторное увеличение величины pH среды (Рис. 8). Вероятно, старт с низких значений pH благоприятствует синхронизации бактериальных клеток в культуре, что приводит к развитию адаптационных механизмов микобактерий к закислению.

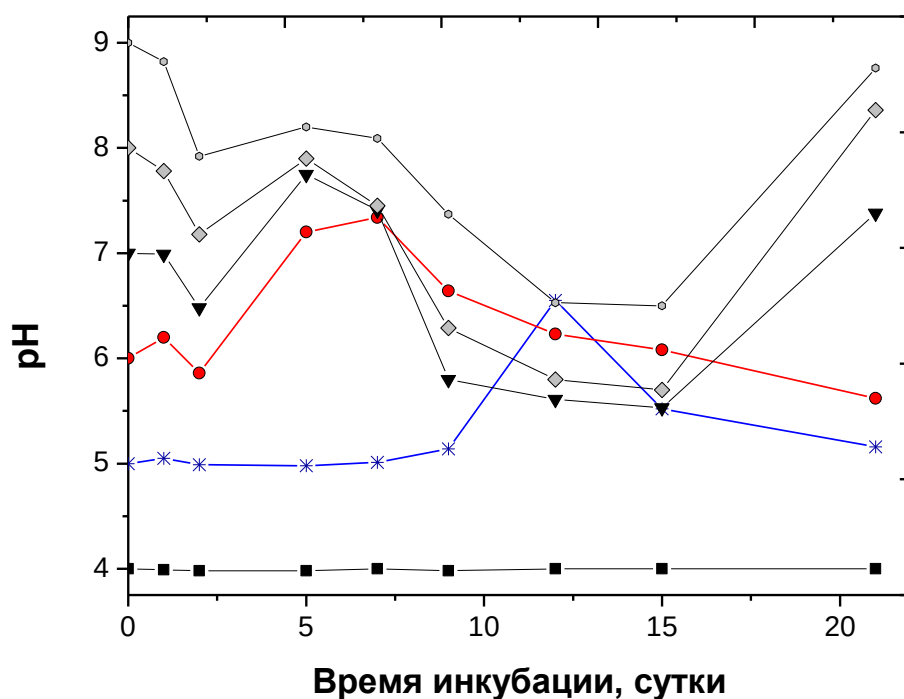


Рис. 8. Динамика изменения значений pH среды при выращивании *M. smegmatis* на среде Сотона с разными стартовыми величинами pH. Культивирование микобактерий происходило при перемешивании, 37°C.

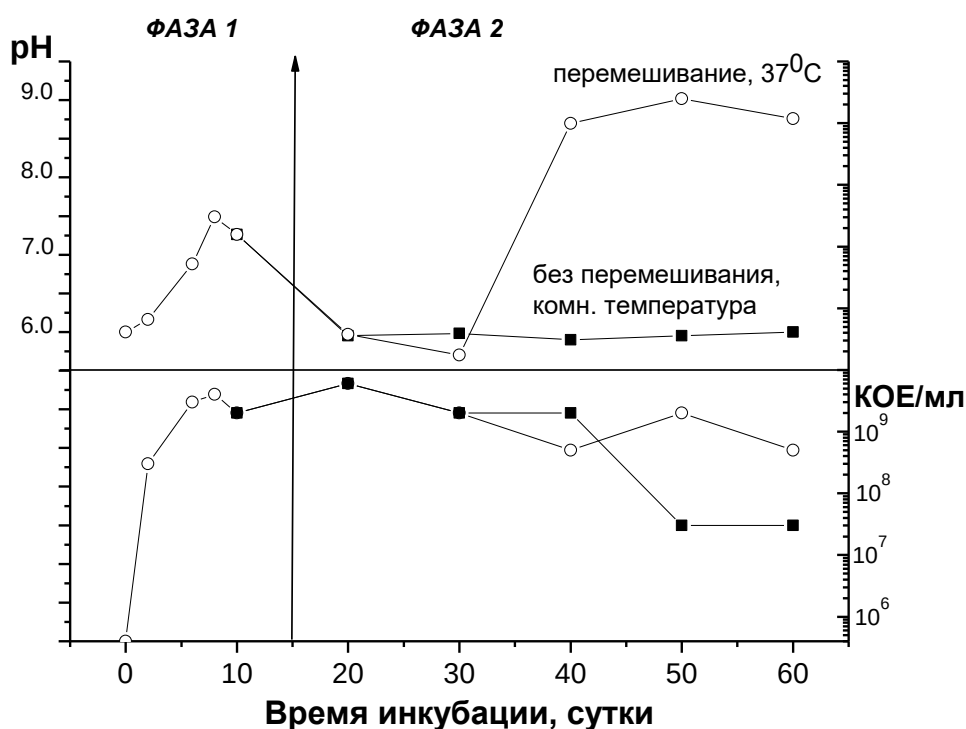


Рис. 9. Влияние условий инкубирования в длительной стационарной фазе роста на значения pH и КОЕ культур *M. smegmatis*: перемешивание (200 об/мин), 37°C (фаза 1), далее культуру разделили на две колбы, первую продолжали выращивать при перемешивании и 37°C (пустые кружки), а вторую инкубировали при комнатной температуре в статических условиях (закрашенные квадраты).

Инкубирование стационарной культуры *Msm*, полученной в условиях постепенного закисления среды после 14 дней роста при перемешивании, в дальнейшем проводили в статических условиях без доступа кислорода при комнатной температуре. Если режим качания не изменялся, то наблюдался вторичный рост клеток и увеличение значения pH среды (Рис.9).

Таким образом, в условиях постепенного снижения pH среды (до pH 5.7-5.8) в стационарной фазе роста культуры на 2.0-2.2 единицы наблюдается образование морфологически измененных овоидных форм *Msm*, доля которых в культуре после месяца хранения составляет 70%.

Как видно на Рис. 2, часть клеток *Msm* при длительном пребывании в слабокислых условиях приобретала «некультивируемый» фенотип, который выражался в потере бактериями способности расти на плотных средах, но при этом они могли расти в жидких средах при проведении специальной процедуры реактивации, о которой будет сказано ниже. Следующей задачей, на решение которой были направлены наши усилия, было достижение большего количества в культуре «некультивируемых» овоидных форм *Msm*. Этого удалось достичь с использованием разработанной нами среды 2АС, в состав которой входят (г/л): глюкоза – 40; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.125; NaCl – 1.5; $(NH_4)_2SO_4$ – 2.5; KH_2PO_4 – 13.6; гистидин (Sigma) – 0.44; глутаминовая кислота (Sigma) – 4; раствор микроэлементов – 8 мл; Твин-80 – 0.05%; pH довели до 6.0 с помощью NaOH. (см. Методы). В этих условиях интенсивность роста клеток не изменялась, но величина pH среды снижалась сразу же после начала фазы активного роста и к 5-ти суткам культивирования достигало значения 4.8. При этом наблюдалось увеличение доли овоидных микобактерий, утративших способность формировать колонии на плотных средах (Рис. 10).

При оценке количества мертвых клеток в культуре с использованием флуоресцентного красителя иодида пропидиума, способного взаимодействовать с ДНК клетки только при повреждении мембранного барьера, было обнаружено, что практически все бактерии, полученной на среде 2АС культуры *Msm*,

сохраняли интактность мембраны после 40 суток хранения при комнатной температуре.

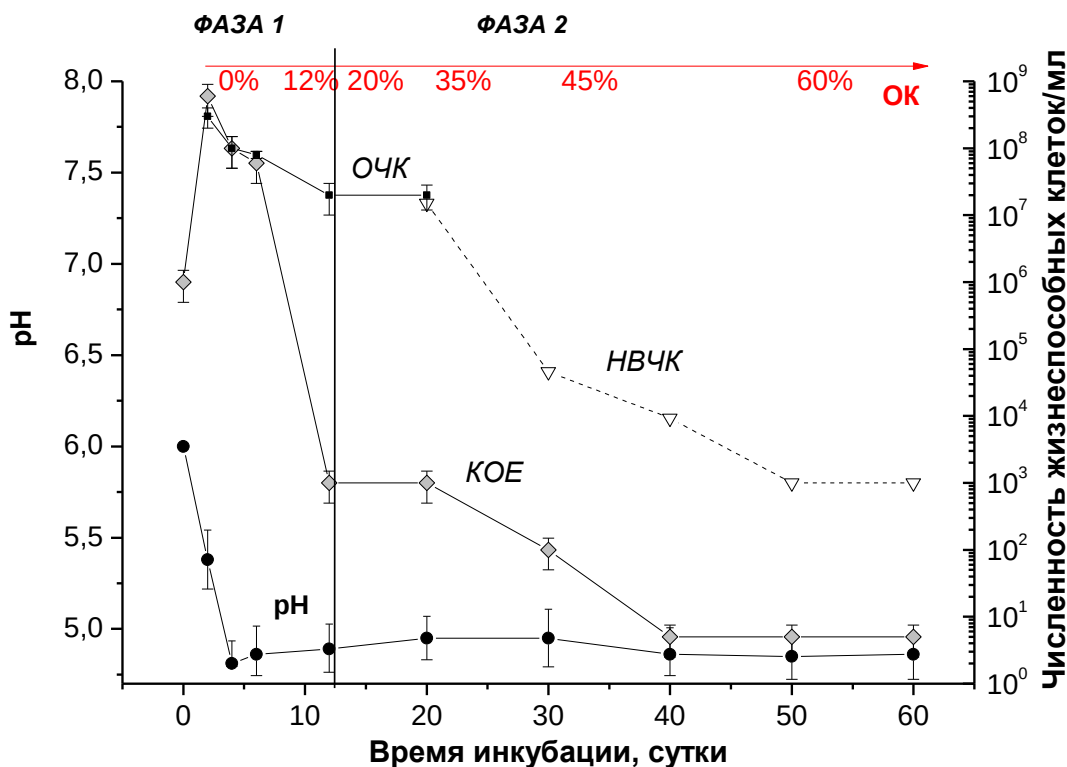


Рис. 10. Изменения значений pH среды и численности жизнеспособных клеток (КОЕ, НВЧК, ОЧК) в культурах *M. smegmatis* при культивировании на среде «2АС» со стартовым значением pH 6.0. Культуры растили при перемешивании до 20 сут при 37°C (фаза 1), затем инкубировали при комнатной температуре без перемешивания (фаза 2). Жизнеспособность клеток определяли по численности КОЕ (на 1 мл), НВЧК (рост на свежей жидкой среде, не содержащей индукторов реактивации) и ОЧК. Представленные данные усреднены по результатам трех экспериментов. Приведены среднеквадратичные отклонения.

Для предотвращения дальнейшего закисления культуры при переносе клеток в статические условия после снижения pH среды до достаточного уровня вносили буфер MES (50 мМ). После 40 суток инкубации при pH 4.8 в этих условиях все клетки *Msm* оказались «некультивируемыми» на плотных средах (0 КОЕ/мл), но способностью к реактивации обладали только 10⁴ клеток/мл (оценка по методу НВЧК) из 10⁷ общего числа клеток (ОЧК)/мл. При дальнейшем хранении микобактерий в этих условиях наблюдалось развитие смертности в культуре, поскольку снижалось количество бактерий, способных реактивироваться в жидких средах, что, вероятно, связано со слишком низким значением pH культуры при хранении. Фактором, благодаря

которому овоидные клетки *Msm* приобрели «некультивируемый» фенотип, является плавное развитие более низкого значения pH на среде 2AC (pH 4.8) по сравнению со средой Сотона (pH 5.7-6.2) в стационарной фазе роста культуры.

Таким образом, образование «некультивируемых» овоидных форм *Msm* является адаптационной стратегией к условиям постепенного закисления внешней среды (до pH 4.8-5.5) в стационарной фазе роста культуры и дальнейшей инкубацией этих культур в статических условиях без доступа кислорода при комнатной температуре.

3.1.2. Образование покоящихся «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis*.

В наших ранних работах было обнаружено, что длительное инкубирование клеток *Mtb* в стационарной фазе развития культуры на среде Сотона без доступа кислорода приводит к образованию «некультивированных» клеток, но их доля среди всех клеток культуры была невелика (меньше 0.1 %) (Shleeva et al., 2002). Как было показано выше для *Msm*, постепенное снижение значения pH в стационарной фазе приводило к образованию морфологически измененных «некультивируемых» форм. Условия, подобранные для получения покоящихся форм *Msm* были применены для культур *Mtb*.

Использование среды Сотона со стартовым значением pH 6.0 привело к развитию выраженной «некультивируемости» клеток *Mtb* на плотных средах, степень которой зависела от глубины закисления культуры (Рис. 11). При росте культуры *Mtb* в этих условиях отмечалось, как в случае *Msm*, увеличение величины pH в логарифмической фазе роста, вероятно, за счет активности аспарагиназы. В стационарной фазе прекращалось деление бактерий, наблюдалось плавное закисление среды и при pH меньше 7.0 происходило снижение числа бактерий, способных расти на плотных средах (КОЕ/мл). Однако при дальнейшей инкубации (свыше 60 суток) наблюдалось увеличение

КОЕ и значения pH, что, вероятно, связано с началом вторичного криптического роста остатка активных клеток в культуре (Рис.11). Таким образом, происходило повторение цикла развития культуры *Mtb*.

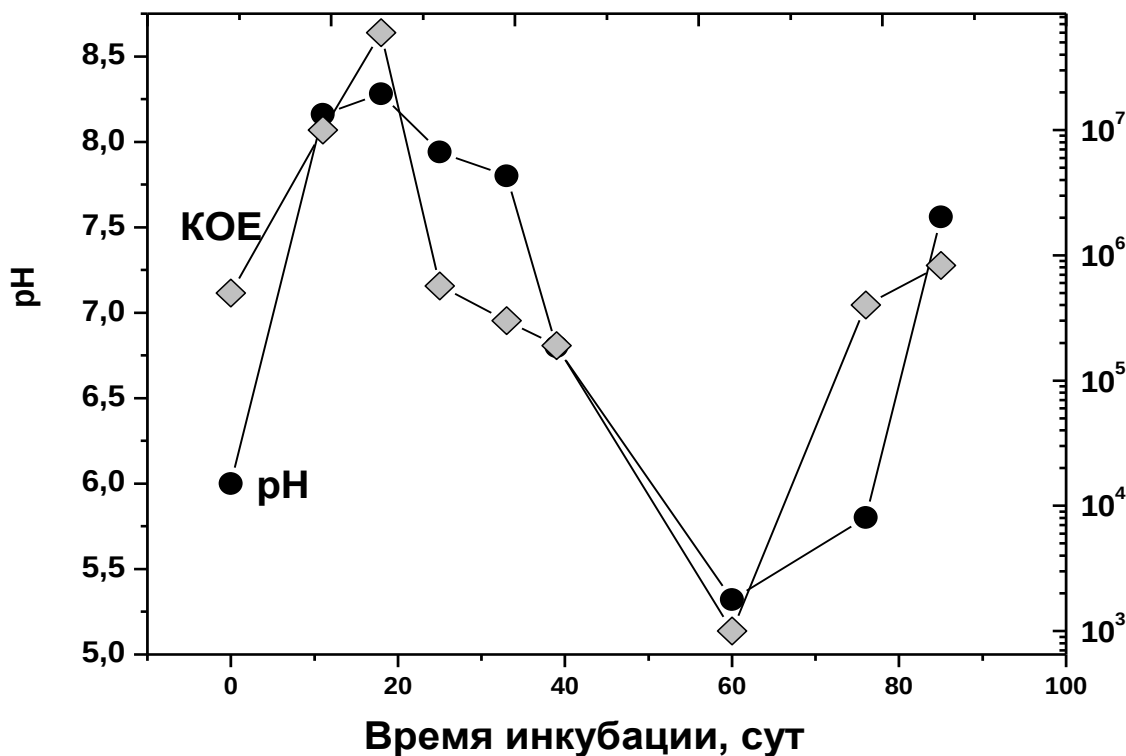


Рис. 11. КОЕ коррелирует с pH среды роста *M. tuberculosis*. Клетки *Mtb* инокулировали в среду Сотона (начальная концентрация 10^5 клеток/мл) и растили на качалке при 37 °С. Начальный pH среды роста был 6,0. Представленные данные усреднены по результатам пяти экспериментов. Приведены среднеквадратичные отклонения.

Было обнаружено, что на среде Сотона клетки *Mtb* способны начать деление, если значение pH среды достигает 6,4, в то время как клетки *Msm* отличаются большей толерантностью и способны к репликации при pH 6,0. Очевидно, что существует определенное пороговое значение кислотности среды, ниже которого невозможен процесс размножения микобактерий. При выращивании клеток *Mtb* в среде Сотона, с увеличенной концентрацией буфера (в 10 раз), что позволило стабилизировать pH на уровне 5,6 или 6,0, более 90 % микобактерий в культуре погибало в течение 20 суток (согласно тесту с иодидом пропидиума) (Рис. 12). Действительно, чтобы начать процесс репликации микобактериям *Mtb*, как и *Msm*, необходимо поднять уровень pH внешней

среды для пригодных для роста значений. При этом часть бактериальных клеток погибает, а оставшаяся часть становится более гомогенной по физиологическому состоянию составляющих ее микобактерий, что в дальнейшем ведет к более синхронному развитию популяции бактериальных клеток. Также как в случае с *Msm*, в культурах *Mtb* при достижении стационарной фазы развития наблюдается плавное, но очень сильное закисление среды (до pH 5.1), но при этом, в отличие от клеток *Msm*, происходит довольно быстрый переход клеток *Mtb* в «некультивируемое» состояние. Однако такое развитие событий приводит и к гибели части популяции клеток при сильном закислении (20-50 % клеток согласно тесту с иодидом пропидиума). Возможно, эти погибшие бактерии являются субстратами для криптического роста адаптированных к стрессу микобактерий, что ведет к увеличению КОЕ после 60 суток культивирования *Mtb* при 37°C в условиях перемешивания (Рис.11).

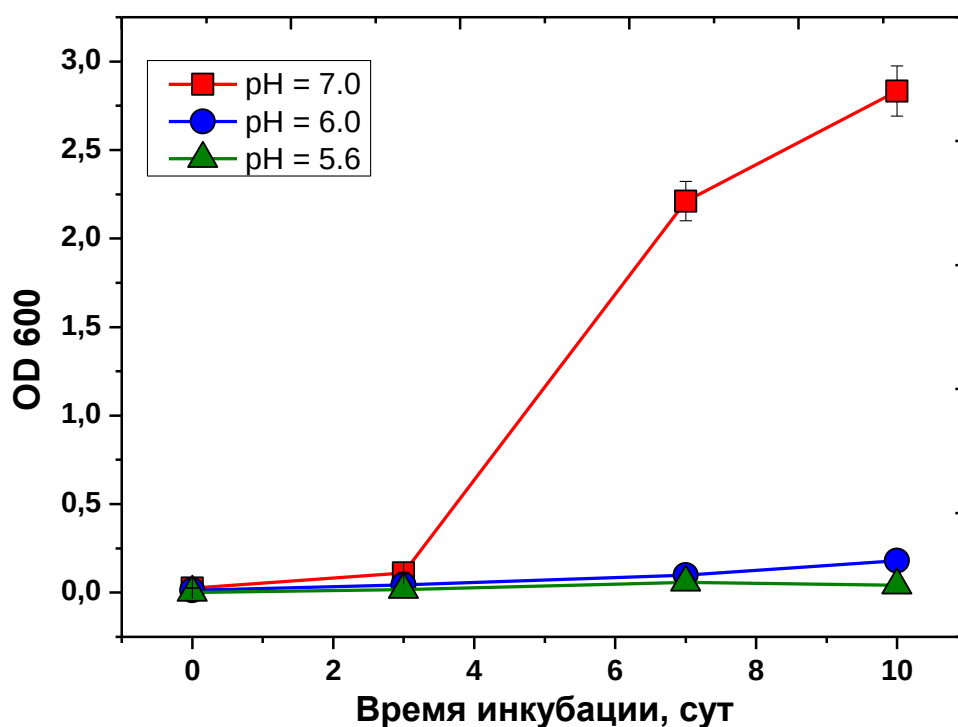


Рис. 12. При значении pH среды ниже 6.0 клетки *M. tuberculosis* не способны к росту. 10^5 клеток/мл засевали в среду Сотона с усиленной буферной емкостью и культивировали с перемешиванием при 37 °C. Стартовый pH был 7.0, 6.0 или 5.6. OD 600 – оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм.

Поскольку важным критерием для покоящихся форм возбудителя латентного ТБ является их способность к длительному хранению, были предприняты меры по снижению глубины закисления культуры в длительной стационарной фазе. Для этого при достижении культурой значения pH 5.8-6.2 (37-45 суток инкубации), к среде добавляли 50 мМ MOPS или MES с этим же значением pH. Затем культуры переносили в плотно закрывающиеся пластиковые пробирки (50 мл) и дальше хранили (в течение нескольких месяцев) при комнатной температуре в статических условиях без доступа кислорода и света. В этих условиях закисление среды замедлялось существеннее (Рис. 13), чем в отсутствии добавочного буфера (Рис. 14), а количество КОЕ к 60 суткам инкубации достигало нулевого значения и больше не изменялось при дальнейшем хранении таких бактерий (Рис. 13).

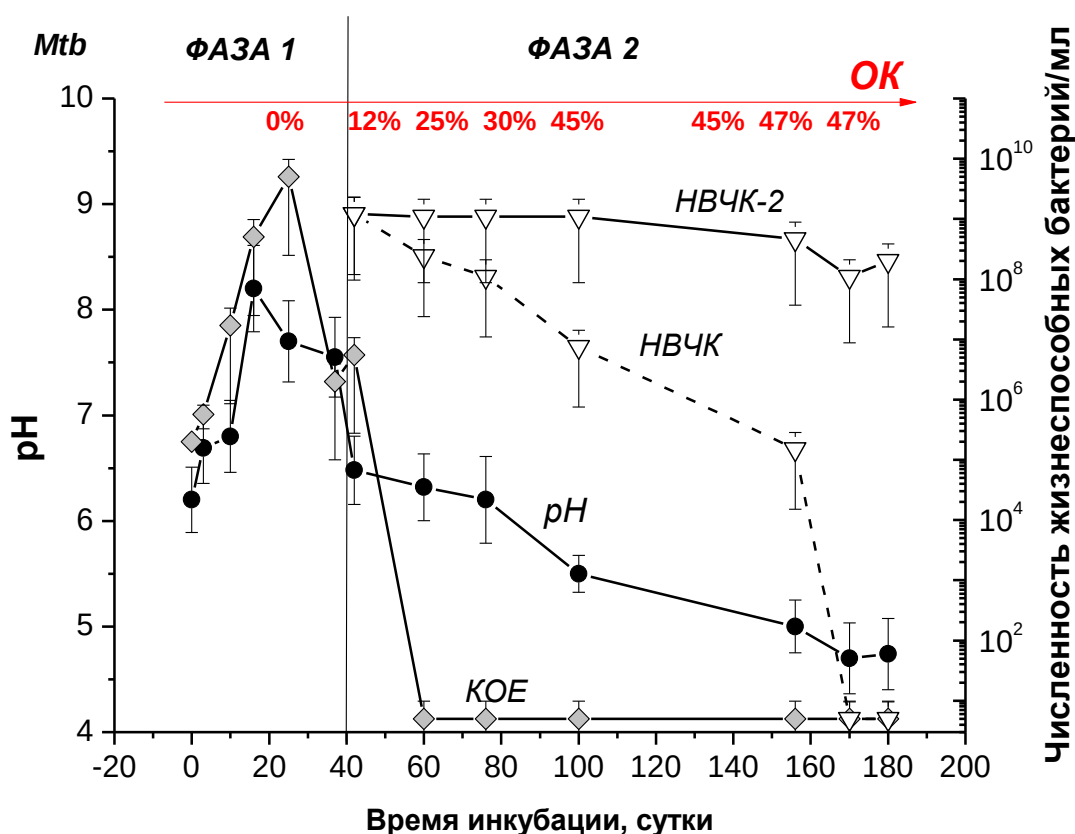


Рис. 13. Образование «некультивируемых» ооидных клеток *M. tuberculosis* при постепенном закислении среды в стационарной фазе. После 40 суток роста в среде Сотона, в среду добавляли 10 мМ MOPS и далее хранили статически без доступа кислорода при комнатной температуре (Фаза 2). Фаза 1 – инкубация с перемешиванием при 37°C. Шкала ОК – увеличение количества клеток ооидной формы, ОК – ооидные клетки. НВЧК – реактивация клеток в жидкой среде; НВЧК 2 - реактивация клеток в супернатанте активных культур.

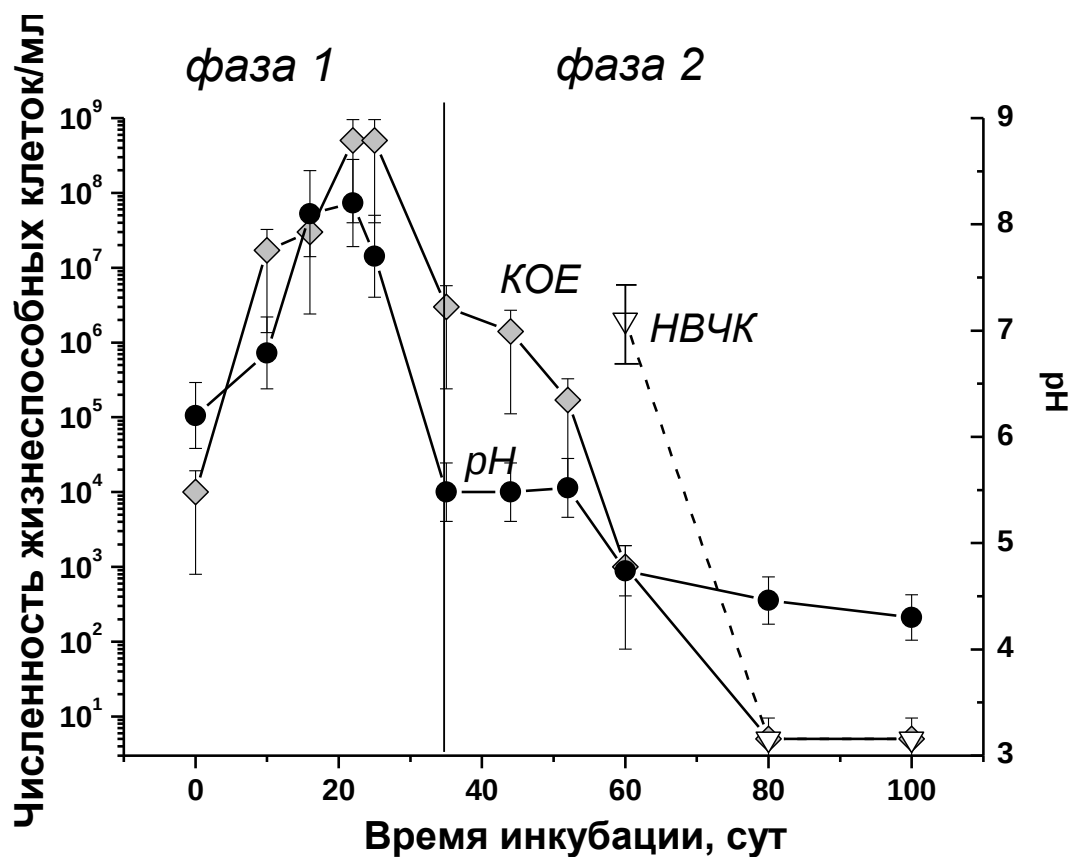
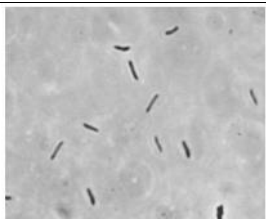
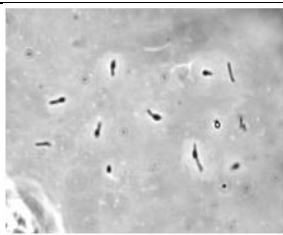
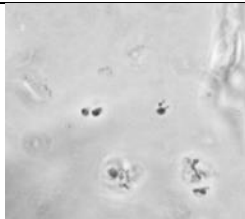
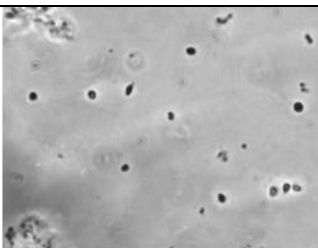


Рис. 14. Сильное снижение pH среды в длительной стационарной фазе приводит снижению количества (НВЧК и КОЕ) жизнеспособных клеток *M. tuberculosis*. Фаза 1 – инкубация с перемешиванием при 37°C, Фаза 2 – инкубация в статических условиях при комнатной температуре.

При микроскопировании культур *Mtb* в процессе их адаптации к условиям постепенного закисления среды роста был обнаружен постепенный переход формы бактериальной клетки от палочковидной к овоидной (Рис.15) и это коррелировало со снижением значения pH среды. В результате, при достижении значений pH среды 6.8-6.2 (около 40 суток инкубации) наблюдается выраженная агрегация палочковидных микобактериальных клеток. При дальнейшей инкубации (50 суток) значение pH среды снижается до 5.8, и при этом наблюдается распад агрегатов клеток с появлением в культуре палочковидных форм со вздутиями на концах (переходные формы), в дальнейшем эти формы преобразовывались в овоидные клетки при значениях pH среды 5.8-5.5 (Рис. 15). Количество «некультивируемых» овоидных клеток *Mtb* (примерно 40 %) не изменялось во время последующих

6 месяцев. Остальные бактерии в этих культурах погибли согласно тесту с иодидом пропидиума.

Значение закисления для образования морфологически-измененных клеток *Mtb* было подтверждено путем модификации среды Сотона (снижение концентрации глицерина до 3%), что привело к поддержанию значения pH на уровне 7.5 в стационарной фазе на протяжении всего эксперимента (Рис.16). В этих условиях не наблюдалось формирование клеток *Mtb* с измененной морфологией (овоидов), а при длительном инкубировании развивалась гибель микобактерий (Рис.16), оцененная по тесту с иодидом пропидиума и отсутствию реактивации в жидкой среде в присутствии супернатанта из активной культуры *Mtb*.

pH 8.5	pH 6.8 – 6.2	pH 6.2 – 5.8	pH 5.8 – 5.5
20 суток	40 суток	50 суток	60 суток и более
			
Рис. 15. Морфологические изменения клеток <i>M. tuberculosis</i> в пост-стационарной фазе при постепенном закислении среды. Фазово-контрастная микроскопия (увеличение x1000).			
 фракция клеток после обогащения культуры овоидными формами			

Полученные в условиях постепенного закисления внешней среды и последующем хранении без доступа кислорода «некультивируемые» овоидные клетки *Mtb* отличались более мелким размером ($1.2\text{--}1.5 \times 0.6\text{--}0.7$

мкм) по сравнению с активными микобактериями ранней стационарной фазы ($1,5-2 \times 0,3-0,4$ мкм).

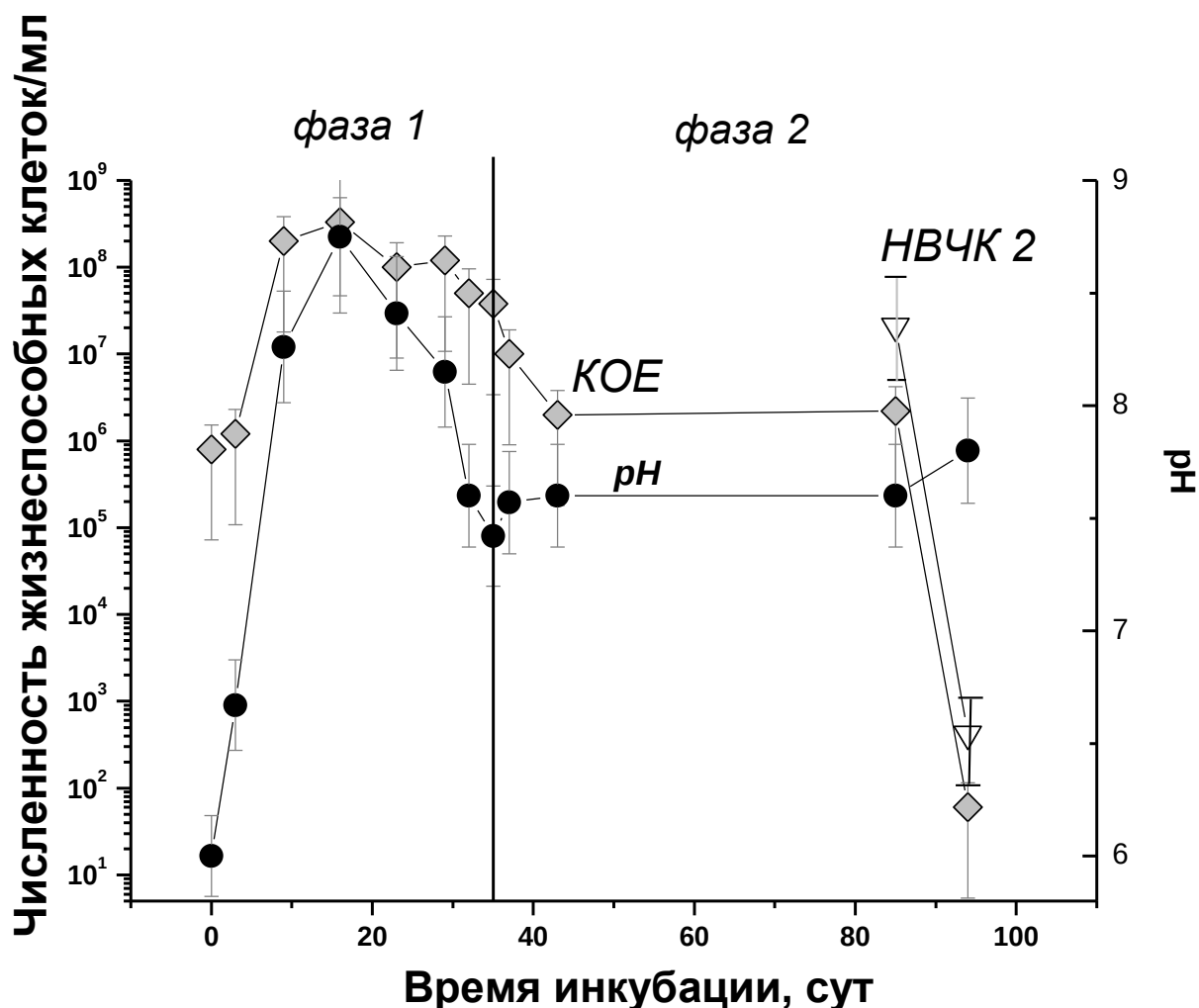
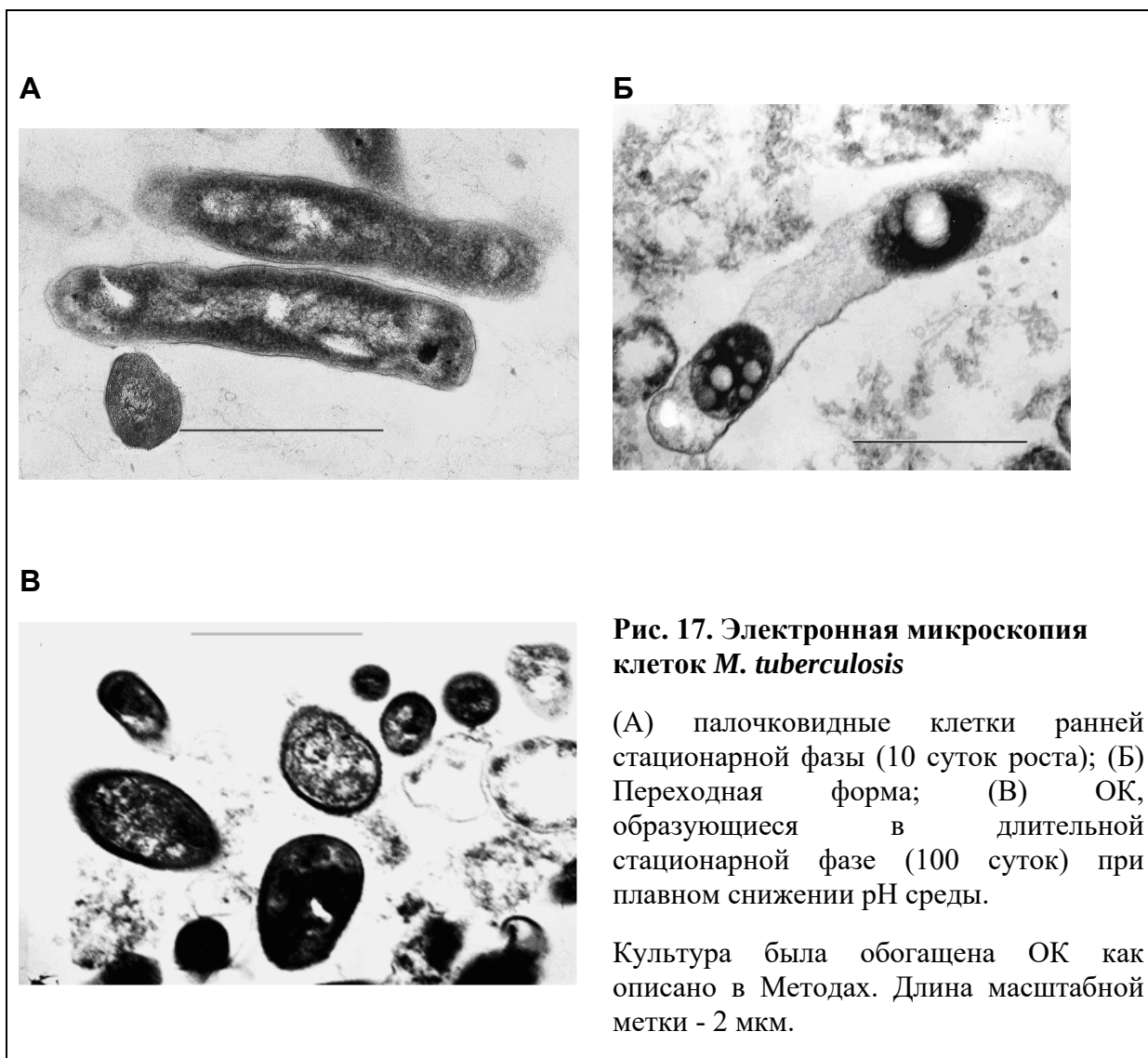


Рис. 16. В отсутствии закисления среды в длительной стационарной фазе не образуются овоидные клетки *M. tuberculosis*. Эксперимент проводили, как описано для рис. 15, за исключением того, что количество глицерина в среде Сотона была 3% вместо 6%. НВЧК 2 – рост в свежей жидкой среде с добавлением супернатанта, полученного из активно растущих культур *Mtb*. Представлены средние значения результатов трех экспериментов. Показаны среднеквадратичные отклонения.

В процессе окрашивания по Цилю-Нильсену овоидные формы *Mtb* приобретали темно-пурпурную окраску, в отличие от розовой окраски, характерной для палочковидных форм микобактерий. Возможно, сильная модификация клеточной стенки в условиях стресса привела к такому свойству овоидных форм *Mtb*. Окрашивание таких клеток на присутствие накопленных

триглицеридов с помощью флуоресцентного красителя Nile Red (Garton et al., 2002) оказалось отрицательным.

Использование метода электронной микроскопии позволило выявить ряд различий между палочковидными и овоидными формами *Mtb* (Рис.17).



В палочковидных формах клеточную стенку микобактерий выстилают два слоя муреина - тонкий электронно-плотный и менее плотный слой; цитоплазма однородная, в ней присутствует некоторое количество электронно-прозрачных включений, имеется нуклеоид с сетчатой структурой (Рис. 17а). В овоидных формах *Mtb* 5-тимесячного возраста представлены короткими электронно-плотными клетками, в которых имеется наружный

капсулярный слой с короткими отростками; цитоплазма негомогенна, в ней обнаруживаются плотные вакуоли и непрозрачные области; нуклеоид компактизирован (Рис. 17в). На Рис.17б продемонстрирована клетка *Mtb*, зафиксированная в момент перехода к овоидному морфотипу.

Овоидные формы микобактерий, полученные в условиях плавного закисления среды в стационарной фазе развития культуры, обладали низкой метаболической активностью и устойчивостью к антибиотикам, в частности к рифампицину (об этом более подробно будет сказано ниже), что позволило нам применить для них термин **покоящиеся микобактерии (ПМ)**.

3.1.3. Получение покоящихся форм *Corynebacterium jeikeium* на основе выявленных подходов и принципов.

Corynebacterium jeikeium – бактерия, обитающая на поверхности кожи человека, для этого вида микроорганизмов характерна множественная лекарственная устойчивость (Tauch et al., 2005). В настоящее время *C. jeikeium* относится к серьезным внутрибольничным патогенам, поскольку вызывает различные тяжелые внутрибольничные инфекции, чаще всего связанные с пациентами с ослабленным иммунитетом, особенно у пациентов с нейтропенией. Факторы риска развития бактериемии *C. jeikeium* у пациентов с опухолевыми заболеваниями повышены при применении постоянного внутрисосудистого катетера, при длительной нейтропении и при лечении множественными антибиотиками. Общая смертность при бактериемии *C. jeikeium* у больных с нейтропенией может достигать 34%. Клиническое беспокойство вызывает тот факт, что клетки *C. jeikeium* обычно устойчивы к множественным антибиотикам и могут инактивироваться только ванкомицином.

Пациенты с диагнозом *Corynebacterium jeikeium* демонстрируют признаки обычной бактериальной инфекции, такой как лихорадка. Предсказанные факторы вирулентности *Corynebacterium jeikeium* в основном участвуют в

обеспечении доступности экзогенных жирных кислот путем повреждения ткани хозяина. Исследования, проведенные на наличие плазмид в *C. jeikeium*, показали, что вместо внехромосомной ДНК именно бактериальная хромосома кодирует большую часть фенотипа мультирезистентности. Однако такая феноменальная резистентность к многим антибиотикам может быть также связана с развитием покоящегося состояния у этого вида инфекции.

Используя накопленный опыт по получению покоящихся форм неспорообразующих бактерий на примере микобактерий, мы подобрали условия для образования таких форм и для *C. jeikeium*. В процессе работы были разработаны специальные минеральные среды для роста этого вида бактерий, которые самостоятельно не могут синтезировать жирные кислоты. Наилучшим вариантом оказалась среда, содержащая (г/л): 0.125 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 2.5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 13.6 г KH_2PO_4 ; 1.5 г NaCl ; 0.44 г Histidine; 4 г glutamic acid; раствор микроэлементов – 8 мл; pH 6.0 (среда 2AS). Также было использовано несколько разработанных нами ранее подходов к получению покоящихся бактерий, а именно использование таких факторов стресса, как недостаток калия, постепенное закисление внешней среды в стационарной фазе и осмотические влияния. Наилучший результат был достигнут при развитии слабокислых значений pH в стационарной фазе роста в присутствии 10 г/л глюкозы. В этом случае одновременно с развитием кислотности среды наблюдалось снижение количества культивируемых на плотных средах бактерий (Рис.18).

Для доказательства жизнеспособности полученных форм была проведена процедура реактивации в присутствии супернатантов культур *C. jeikeium*, полученных из активной фазы роста бактериальных клеток, методом НВЧК. Были протестированы как минеральные, так и пептонные среды для получения супернатанта, обладающего реактивирующей активностью.

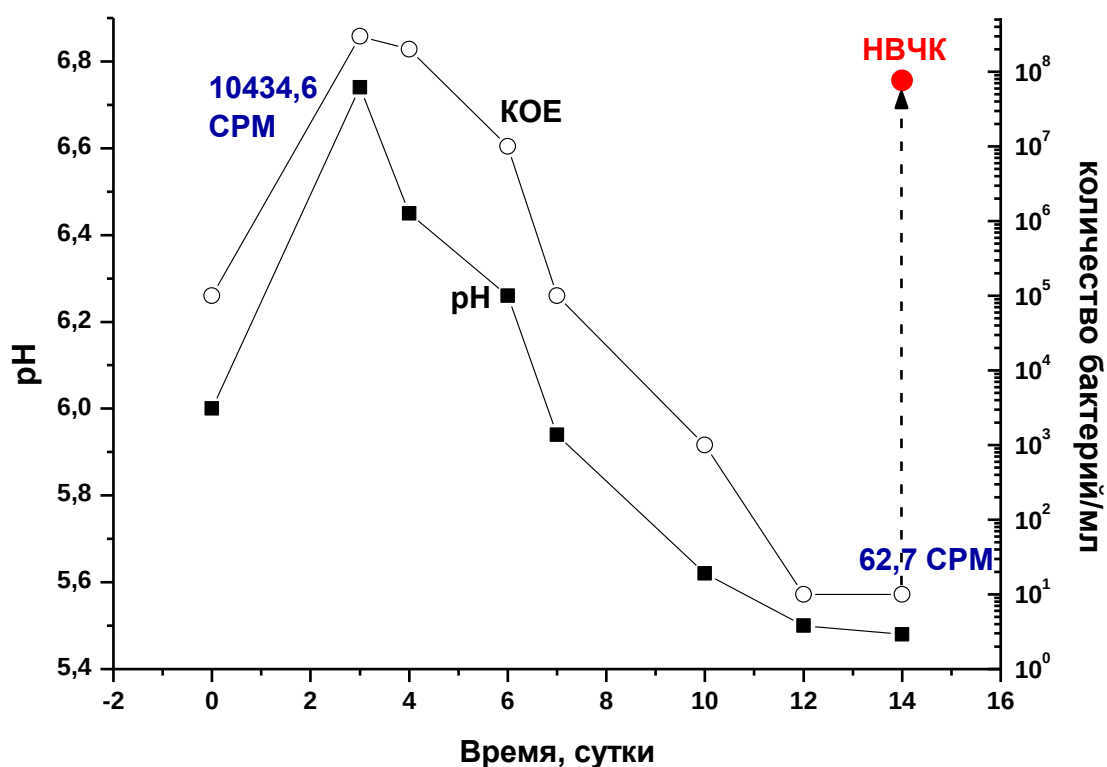


Рис. 18. Образование покоящихся «некультивируемых» клеток *C. jeikeium*. CPM рассчитывали на мг влажного веса клеток.

Наиболее активным оказался вариант с использованием Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) (Himedia, India) и возрастом супернатанта 5-12 часов (Рис. 19). Согласно программе BLAST, в коринебактериях *C. jeikeium* имеется три белка, аналогичные белкам семейства Rpf (Resuscitation promoting factor) из микобактерий, которые предположительно могут принимать участие в процессе реактивации покоящихся форм коринебактерий. Этими белками являются JK_RS02150/jk0416 (RpfA), JK_RS07760/jk1512 (RpfB) и JK_RS00265/jk0051 (RpfC). Появление реактивирующей активности в супернатантах логарифмической культуры клеток указывает на реальность такой возможности.

Таким образом, очевидно, что разработанные нами подходы к получению и реактивации покоящихся «некультивируемых» форм микобактерий применимы и в случае родственных патогенных коринебактерий. Кроме этого, ранее нами было продемонстрировано подобное явление для почвенной бактерии *Rhodococcus rhodochrous* (Shleeва

et al., 2002). Суммируя полученные данные, можно предположить, что существуют биологические закономерности образования покоящихся форм и выхода из этого состояния, которые являются общими для ряда неспорообразующих бактерий порядка Актиномицетов.

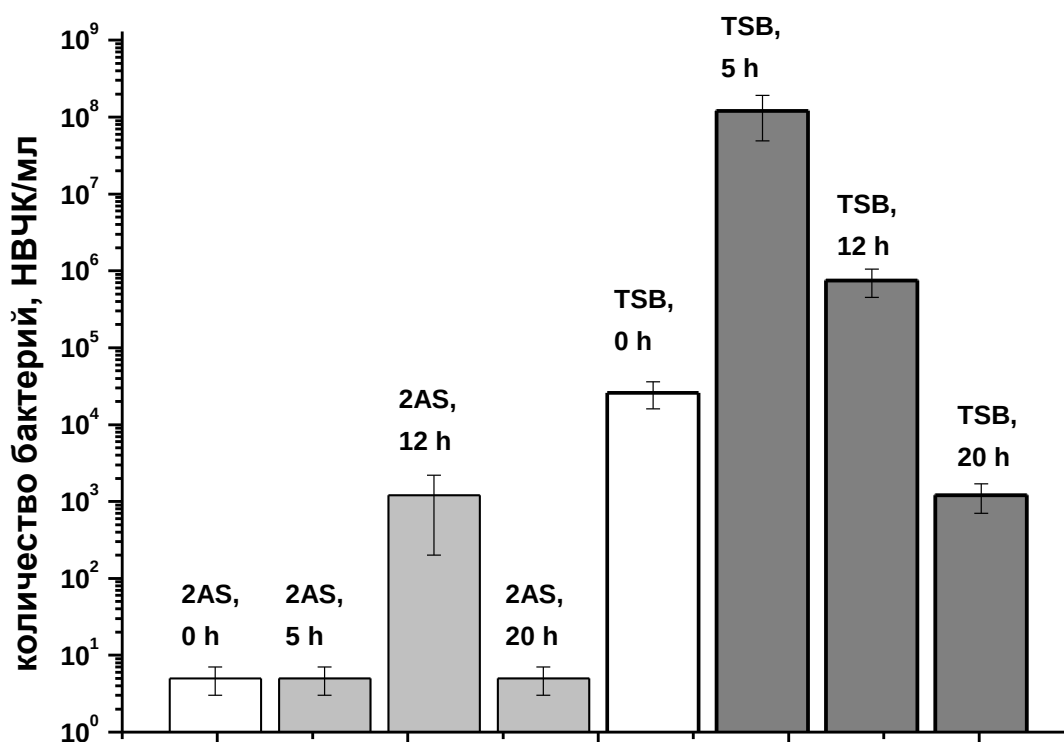


Рис. 19. Реактивация покоящихся форм *C. jeikeium* в присутствии супернатантов разного возраста, полученных с применением разных сред. 2AS – состоящая из двух аминокислот и солей (разработана в данной работе); TSB – соевый триптон (Himedia, Индия).

3.1.4. Модель латентного туберкулеза *in vivo* на основе покоящихся форм микобактерий, полученных *in vitro*.

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 10⁵ бактерий на мыш. Наблюдения за динамикой прогрессирования инфекции проводили в течение 1.5 лет. Были охарактеризованы степень покоя и условия для

реактивации трех типов клеток *Mtb*, полученных *in vitro* в условиях постепенного закисления внешней среды. Эти типы бактерий различались сроком хранения в статических условиях без доступа кислорода при комнатной температуре и разной степенью покоя и культивируемости (Таблица 3).

Таблица 3. Оценка жизнеспособности покоящихся клеток *Mtb*, полученных *in vitro**

Тип покоящихся клеток <i>Mtb</i>	Общее число бактериальных клеток в 1 мл	КОЕ на плотных средах в мл	Реактивация в свежей жидкой среде Бактерии в 1 мл (метод НВЧК)	Реактивация в жидкой среде с индуктором** Бактерии в 1 мл (метод НВЧК2)
А	10^6	$(7 \pm 3) \times 10^2$	$(7.4 \pm 6.6) \times 10^3$	$> 10^6$
Б	6×10^6	0	$(4.3 \pm 3.4) \times 10^5$	$(4.6 \pm 3.7) \times 10^6$
В	2×10^6	0	0	$(5.4 \pm 5.2) \times 10^5$

*Покоящиеся микобактерии были получены в условиях постепенного закисления внешней среды. (А – 60 суток, Б – 80 суток, В – 180 суток). Общее число бактерий в пробах оценивали микроскопически. Способность к росту была оценена как методом КОЕ (небольшие колонии) на среде Сотона с агаром, так и методом НВЧК в жидкой среде. Для усиления эффективности реактивации покоящихся бактерий в методе НВЧК были использованы индукторы. Бактерии типов Б и В не формировали колоний на плотной среде и могут рассматриваться как «истинно некультивируемые». **Супернатант, полученный из культуры *Mtb* логарифмической фазы роста, был добавлен к среде реактивации в пропорции 1:1.

Тип А – бактерии были частично «некультивируемы» и, вероятно, относились к фазе раннего покоя. Они формировали небольшие колонии (ограниченные деления бактерий) на плотных средах с агаром и частично восстанавливали свою численность в свежих жидких средах без каких-либо специфических индукторов. Добавление супернатанта, полученного из микобактериальных культур логарифмической фазы роста, к среде реактивации позволило восстановить гораздо большее число бактерий в сравнении с группой спонтанно-реактивирующихся клеток *Mtb*. Тип Б – бактерии утратили способность формировать колонии на плотных средах (истинная «некультивируемость»), но были способны к росту в жидких средах

без добавления индукторов реактивации (условно назовем это фазой среднего покоя). Тип С – покоящиеся «некультивируемые» микобактерии в состоянии глубокого покоя, способные возобновлять свой рост в жидких средах только в присутствии супернатанта, полученного из культур *Mtb* логарифмической фазы роста (Таблица 3). Ниже, в разделе «Реактивация» будут обсуждаться экзогенные индукторы, способные активировать реактивацию микобактерий, находящихся в состоянии глубокого покоя.

После инфицирования мышей бактериями типа А (стадия раннего покоя) не наблюдалось никаких видимых признаков заболевания вплоть до 180 суток после заражения, когда некоторые мыши, принадлежащие линии I/St (чувствительной к ТБ), проявили первые признаки болезни (растрепанный мех и 2-3% потери массы тела).

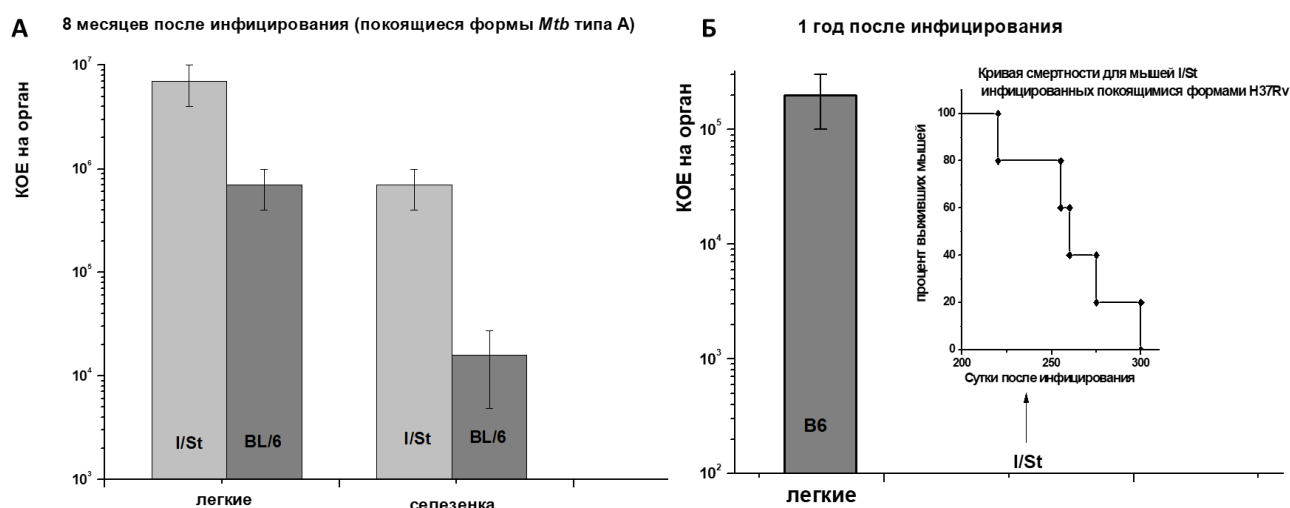


Рис. 20. Протекание заболевания, вызванного микобактериями, пребывающими в фазе раннего покоя (тип А). Мыши В6 и I/St линий были инфицированы как описано в Методах, и оценка КОЕ в органах проводилась через 8 (А) и 12 (Б) месяцев после заражения. Мыши линии В6 эффективно контролировали инфекцию в легких ($\sim 5 \times 10^5$ и $\sim 2 \times 10^5$ КОЕ после 8 и 12 месяцев, соответственно), в то время, как мыши линии I/St умирали от болезни между 220 и 300 сутками после заражения (Б). Количество КОЕ от 5 мышей на группу оценивалось индивидуально, и результаты отображались как среднее $\pm$ стандартное отклонение. $P < 0,01$ между мышами В6 и I/St, t-критерий Стьюдента (А).

Как показано на Рис. 20а, оценка количества КОЕ после 8 месяцев инфицирования демонстрирует, что бактерии стали размножаться в легких (100-кратное увеличение количества бактерий в легких чувствительных к ТБ

мышей I/St и 10-кратное увеличение числа бактерий в легких устойчивых к ТБ мышей В6 по сравнению с дозой бактерий, полученной при инфицировании) и распространяться на селезенки у мышей обеих линий.

Количество КОЕ было в 10 раз выше в легких и почти в 100 раз выше в селезенках мышей, генетически чувствительных к ТБ. Вполне ожидаемо, что инфекция, вызванная покоящимися бактериями в наших экспериментах, развивалась намного медленнее, чем инфекция, вызванная активными бактериями логарифмической фазы роста: интратрахеальное заражение всего 10^3 активными бациллами приводило к полной гибели даже генетически резистентных мышей на 4-м месяце инфекции (Eruslanov et al., 2004). Через год после заражения, мыши линии В6 внешне выглядели здоровыми и количество КОЕ в их легких ($\sim 10^6$ на орган) не менялось между 8 и 12 месяцами инфекции (Рис. 20б). Ранее было показано, что после интраназального заражения мышей В6 нереплицирующимися микобактериями, полученными в условиях гипоксии в 28-суточной модели Вейна, появление КОЕ в легких было отсрочено по сравнению с обычным заражением активными бактериями логарифмической фазы роста, но через несколько недель кинетика роста микобактерий и количество КОЕ у двух групп мышей сравнялись (Woolhiser et al., 2007). Важно отметить, что лишенные кислорода бактерии в модели Вейна сохраняют некоторую метаболическую активность и способность образовывать колонии на плотных средах, что, по-видимому, отражает раннюю стадию состояния покоя (Mukamolova et al., 2003). В наших экспериментах микобактерии типа А, очевидно, являются «более покоящимися» и вызывают более легкую хроническую болезнь у генетически устойчивых мышей В6 без смертности, по крайней мере, в течение года. Поразительно, что все чувствительные мыши I/St умерли до 10-го месяца после заражения (Рис. 20б), демонстрируя, что прогрессирование и исход болезни реактивации зависят от уровня генетической восприимчивости даже больше, чем во время инфекции,

вызванной полностью активно размножающимися бактериями (Eruslanov et al., 2004; Kondratieva et al., 2010).

У мышей обеих линий, зараженных микобактериями типа Б, признаков заболевания не было более года. Мышей умерщвляли на 18-м месяце после заражения и, несмотря на нормальный внешний вид их легких и отсутствие явной патологии - оценивали количество КОЕ в гомогенатах цельных органов. Как показано на Рис. 21, колониеобразующие микобактерии легко обнаруживаются в органах мышей обеих линий. Интересно, что у мышей линии В6 количество КОЕ в легких и селезенке после 18-ти месяцев заражения бактериями типа Б было практически идентично числу КОЕ в органах мышей на 8-12-м месяцах после заражения бактериями типа А (Рис. 20). Этот результат свидетельствует о том, что генетически устойчивые животные эффективно контролируют реактивацию инфекции даже после начала процессов старения.

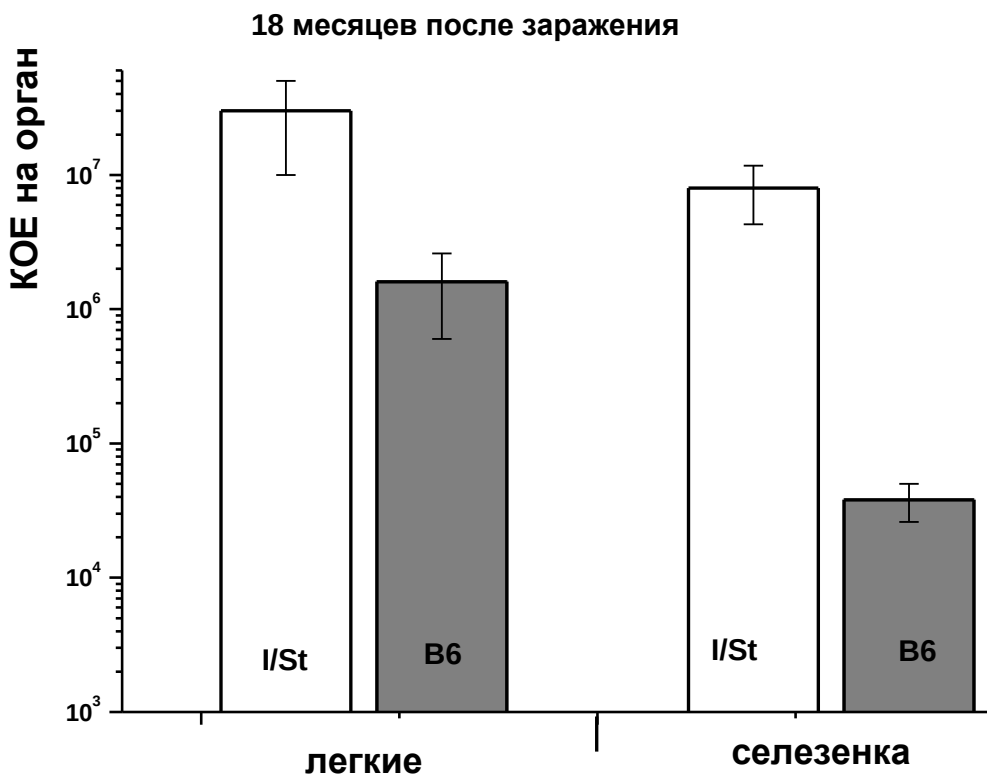


Рис. 21. Протекание заболевания, вызванного микобактериями фазы «среднего» покоя (тип Б). На 18-м месяце после заражения было выделено значительно (Р

<0,01) больше КОЕ из легких и селезенки мышей линии I/St, по сравнению с мышами B6. См. также подпись к Рис. 20.

Напротив, у мышей линии I/St, инфицированных бактериями типа Б, количество КОЕ в легких и селезенке на 18-м месяце после заражения было соответственно в 5 и 10 раз выше, чем у мышей, инфицированных микобактериями типа А, на 8-м месяце (Рис. 20 и 21).

Таким образом, хотя способность к реактивации у бактерий типа Б была намного ниже по сравнению с бактериями типа А (мыши I/St пережили заражение типом Б), генетически восприимчивым мышам все же не удалось эффективно контролировать рост микобактерий. Невозможно было получить надежную кривую выживаемости после заражения клетками типа Б, так как продолжительность жизни животных была исчерпана.

Наконец, во всех трех временных точках эксперимента (месяцы 8, 12, 18) не было получено КОЕ из органов животных, инфицированных бактериями типа В, что указывает на то, что для реактивации этих сильно ослабленных клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя, продолжительность жизни мыши может быть слишком короткой для осуществления процесса реактивации или их состояние покоя было настолько глубоким, что механизмы инфекционного контроля были достаточными для предотвращения реактивации даже у мышей, относящихся к чувствительной к ТБ линии.

В этих экспериментах впервые описана реактивация «некультивируемых» микобактерий, полученных *in vitro*, на модели инфекции на животных. Очевидно, что реактивация микобактерий зависит как от глубины покоя инфицирующих бактерий, так и от генетической восприимчивости хозяина. А именно, покоящиеся «некультивируемые» микобактерии, которые способны к самопроизвольной реактивации *in vitro* (тип А и Б), способны восстанавливаться в мышах, в отличие от бактериальных клеток, требующих присутствия индукторов для реактивации

(тип В). Мы не можем исключить, что бактерии типа В, образованные *in vivo*, могут быть способны к реактивации, когда такие индукторы имеются в определенных условиях *in vivo*. Например, наличие ненасыщенных свободных жирных кислот может быть полезным для реактивации «некультивируемых» микобактерий (об этом будет сказано ниже).

Результаты, полученные при заражении мышей бактериями типа В, демонстрируют, что микобактерии, которые полностью утратили способность образовывать колонии на плотных средах, действительно выживают в организме млекопитающего и вызывают хроническую форму ТБ. Созданная модель может быть применена для дальнейшего изучения взаимодействий между хозяином и патогеном и для тестирования вакцин и кандидатов на лекарства, специально предназначенных для борьбы с латентным ТБ.

3.2. Характеристика покоящихся клеток микобактерий.

Для оценки биохимических изменений, происходящих в бактериальных клетках в процессе перехода к покоящемуся «некультивируемому» состоянию, было необходимо разработать некоторые подходы для выделения чистой фракции интересующих нас интактных овоидных форм микобактерий, поскольку культуры представляли собой смесь из покоящихся овоидных клеток, переходных форм и мертвых бактерий.

При центрифугировании в градиенте сахарозы от 1.4 до 2.2 М активно растущих и длительно хранившихся культур *Msm*, содержащих покоящиеся овоидные клетки (40-50 суток хранения), было обнаружено, что плавучая плотность активных бактерий соответствует 1.214 г/мл, в то время, как 70 % ОК характеризовались плавучей плотностью 1.278 г/мл (Рис. 22, Таблица 5). В случае с культурами клеток *Mtb* различия в плавучей плотности между активными и покоящимися бактериями более выражены (1.3 г/мл для активно растущих бацилл и 1.6 г/мл для покоящихся ОК) (Таблица 5). Возможно, такие различия между активными и покоящимися микобактериями отражают

существенные изменения в белок-липидном соотношении покоящихся ОК как *Msm*, так и *Mtb*.

сахароза, М	вегетативные клетки	пост-стационарные клетки
1.4		
1.5		
1.6		
1.7		
1.8		
1.9		
2.0		
2.1		
2.2		

Рис. 22. Распределение активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* в градиенте сахарозы.

Второй подход для выделения фракции ОК заключался в следующем: культуру микобактерий центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин в пластиковых пробирках объемом 50 мл; осадки клеток ресуспендировали в холодном фосфатном буфере, содержащем 0.1-0.5 М NaCl (pH 5.5) и несколько раз интенсивно встряхивали до формирования плотной пены (Рис. 23а). Следующее центрифугирование проводили в течении 15 мин при 3000 об/мин, при этом наблюдалось расслоение биомассы клеток. Вместе с супернатантом удаляли верхний слой, который содержал в основном мертвые и лизированные бактерии (Рис. 23б, в). Осадок вновь ресуспендировали в этом же буфере и повторяли эти манипуляции 10-20 раз до прекращения образования верхнего слоя. В результате основная часть биомассы была представлена ОК микобактерий (80-90 %) (Рис.24).

А
В



Б

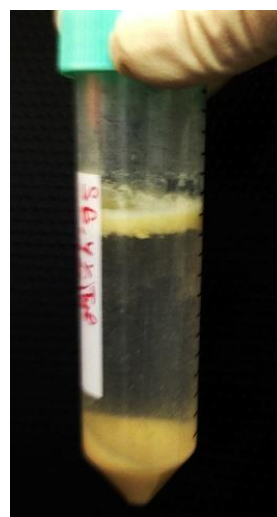
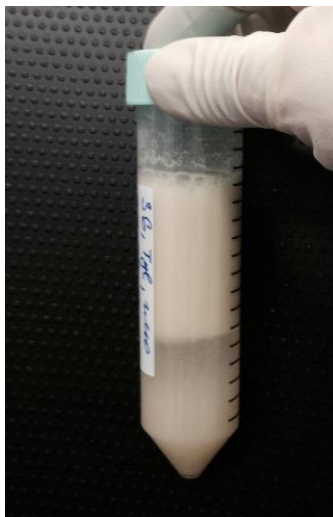


Рис.23. Удаление примеси мертвых клеток из культуры покоящихся форм *M. tuberculosis*.

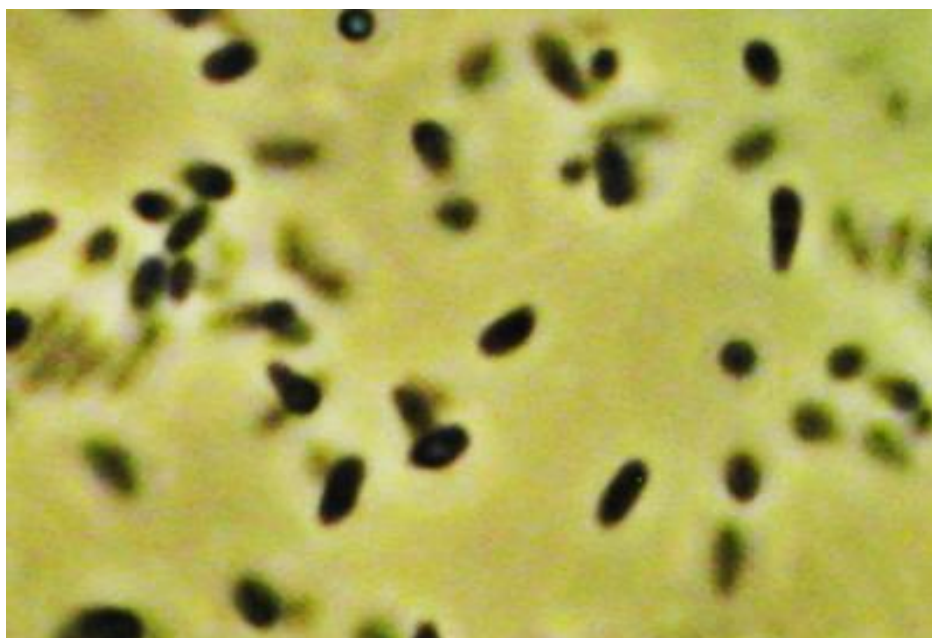


Рис.24. Очищенные покоящиеся формы *M. tuberculosis*.

3.2.1. Оценка способности покоящихся микобактерий к росту на плотных и жидких средах.

В процессе хранения ОК *Msm*, полученных в условиях постепенного закисления среды в стационарной фазе на среде Сотона, при комнатной температуре и без доступа кислорода в течение 60 суток отмечалось снижение числа КОЕ на 1.5-2 порядка (Рис.2) и на 5 порядков после года хранения в таких условиях. При этом количество жизнеспособных клеток *Msm* в культурах 60-суточного возраста при использовании метода предельных разведений в жидких средах и подсчета наиболее вероятных чисел клеток (НВЧК) оказалось на 1-2 порядка выше числа КОЕ (Рис. 2). Очевидно, 99% ОК *Msm* утратили способность к культивированию на плотных средах, но сохранили потенциал к росту на жидких средах, что доказывает их жизнеспособность.

Использование среды 2АС для получения ОК *Msm* позволило получить большее количество «некультивируемых» микобактерий в культуре, за счет развития более низких значений pH в стационарной фазе развития культуры. В этом случае после 40 суток хранения культур при pH 4.8 все бактериальные клетки проявили «некультивируемый» фенотип при высеве на плотные среды (КОЕ/мл = 0), но 10^4 бактерий/мл оказались жизнеспособными при определении НВЧК. При дальнейшем хранении таких культур свыше 2-х месяцев при pH 4.8 наблюдалась постепенная гибель способных к реактивации клеток.

Несмотря на потерю способности расти на плотных средах, овоидные клетки *Mtb*, образованные в условиях постепенного закисления в стационарной фазе и затем хранившиеся без доступа кислорода при комнатной температуре, не окрашивались иодидом пропидиума, что указывает на сохранение в них потенциальной жизнеспособности. Для таких бактерий была разработана процедура реактивации с использованием метода конечных разведений в жидких средах и определения НВЧК. Для восстановления

культивируемости *Mtb* ПМ культивировали в смеси среды Сотона и мясо-пептонного бульона (1:1) с содержанием глицерина 0.6 % (см. Методы) и ADC. Так, покоящиеся культуры *Mtb*, хранившиеся 60 суток, не могли расти на плотных средах (КОЕ = 0), но были способны к спонтанной реактивации в жидкой среде (НВЧК = 3×10^8 клеток/мл) (Рис. 13, НВЧК-1). При дальнейшем хранении такой культуры уменьшалась способность покоящихся форм *Mtb* к спонтанной реактивации в жидких средах, и к 180 суткам хранения практически исчезла. Такие формы микобактерий были способны возобновить рост в присутствии супернатанта, полученного из активно-растущих культур *Mtb*. Количество бактерий, реактивированных в присутствии супернатанта, держалось на одном уровне вплоть до 180 суток эксперимента (Рис.13, НВЧК-2). В Таблице 4 представлены данные, отражающие способность клеток *Mtb* из разных физиологических фаз к росту на плотных и жидких средах.

Таблица 4. Культивируемость клеток *Mtb* разных физиологических состояний на плотных (КОЕ) и жидких средах в присутствии супернатанта активных культур (НВЧК-2).

Фаза развития клеток <i>Mtb</i> /тип клеток	Жизнеспособность, бактерий/мл	
	КОЕ	НВЧК-2
Конец логарифмической фазы роста/длинные палочки (10 суток)	$3 \cdot 10^8$	$4.3 \cdot 10^{8*}$
Длительная стационарная фаза/укороченные палочки (40 суток)	$2.5 \cdot 10^6$	$3.6 \cdot 10^{8**}$
Состояние покоя/ овоиды (70 суток)	0	$3 \cdot 10^{8***}$

Доверительный интервал для НВЧК

	минимум	максимум
*	$9 \cdot 10^7$	$1.8 \cdot 10^9$
**	$1.7 \cdot 10^7$	$1.8 \cdot 10^9$
***	$1.5 \cdot 10^8$	$9.6 \cdot 10^8$

Очевидно, что овоидные формы *Mtb* обладают свойством «некультивируемости» на плотных средах (подобно возбудителю латентного

ТБ), но способны к реактивации в жидких средах *in vitro*, что подтверждает их жизнеспособность. Необходимость индуктора для активации длительно хранившихся микобактерий, указывает на состояние глубокого покоя таких форм, во время которого, возможно либо истощаются собственные ресурсы на поддержание жизнеспособности клетки, либо накапливаются какие-то повреждения, вызванные длительным стрессом.

В процессе реактивации овоидная форма ПМ сменяется на палочковидную. Анализ 16S РНК реактивированных форм *Mtb* выявил 100% идентичность со штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

3.2.2. Активность метаболизма покоящихся овоидных «некультивируемых» микобактерий и их устойчивость к антибиотикам и повышенным температурам.

При переходе микобактерий из палочковидной формы в овоидную в процессе постепенного закисления внешней среды в стационарной фазе наблюдалось заметное торможение активности метаболизма. Заметно падала активность синтеза РНК и ДНК, оцененная путем включения радиоактивных предшественников, сильно снижался внутриклеточный уровень АТФ и цАМФ (Таблица 5). Отсутствие восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP) и метиленового синего овоидными формами *Msm* и *Mtb*, указывает на ингибирование активности дыхания в таких бактериях. При развитии закисления в стационарной фазе (Рис. 13) в клетках *Mtb* происходит снижение активности синтезов РНК в 7.5 раз, оцененное путем включения 5,6-³H-урацила (активные микобактерии - 75000 имп/мин; бактерии стационарной фазы в условиях закисления 40 суток - 10761 имп/мин) (Таблица 5), что сопровождается снижением КОЕ (Рис. 13). При дальнейшем хранении закисленных культур в статических условиях без доступа кислорода (70 суток) наблюдалось снижение скорости включения радиоактивной метки до недетектируемых значений (Таблица 5).

Таблица 5. Биохимические изменения в клетках *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* при переходе в состояние покоя. В закрашенных полях представлены данные для *Mtb*.
 Вегетативные клетки *Msm* - 2 сут культивирования, *Mtb* – 10 сут, клетки стационарной фазы *Msm* – 20 сут, *Mtb* – 40 сут, ОК *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
		569 ± 47	341± 22.7	9.7 ± 8.2
цАМФ пмоль/мг влажной биомассы бактерий		116±16	-	28±6
		124±4	-	2±1
Плавучая плотность клеток (г/мл)		1.214 ± 0.01	1.23 ± 0.01	1.278 ± 0.01
		1.30 ± 0.1	-	1.60 ± 0.1
Активность дыхательной цепи: восстановление DCPIP, нмоль DCPIP /мин/ мг клеток		0.18±0.01	-	0.01±0.005
		0.11±0.03	-	0.016±0.003
Термо-устойчивость клеток (% от контроля без прогревания)**	60 °С	65±5	75±4	85±7
		1±0,5	-	70±5
	70 °С	9±3	12±4	18±4
		.002±0,001	-	70±5
	80 °С	2±1	4±2	10±6
		0	-	0.5±0.1
Устойчивость клеток к антибиотикам***	Гигромицин	1×10 ²	2×10 ³	1×10 ⁷
		1x10 ³	-	5x10 ⁷
	Тетрациклин	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 (1×10^9 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 1×10^8 клеток (1 сут для *M. smegmatis* и 17 сут для *M. tuberculosis*).

Также, при формировании клеток овоидной формы и «некультивируемым» фенотипом в культурах *Mtb* снижался уровень АТФ и цАМФ. Несмотря на то, что индивидуальная концентрация динуклеотидов в покоящихся бактериях была в 10 раз меньше, чем в активных, соотношение НАД/НАДН оказалось практически одинаково, что может свидетельствовать в пользу протекания реакций, вследствие которых происходит генерация и расходование НАДН в ПМ (Таблица 5).

Поскольку уровни АТФ (особенно для *Mtb*), цАМФ, соотношение НАД/НАДН и активность дыхательной цепи (Таблица 5) были заметно снижены в ПМ, но все-таки детектировались, можно предположить, что имеется некий «остаточный» метаболизм на низком уровне, что, возможно, необходимо для поддержания жизнеспособности клетки в период длительного покоя.

Как уже говорилось выше, пребывая в состоянии глубокого покоя, сопровождающегося развитием «некультивируемости», овоидные формы *Mtb* были способны к реактивации и возобновлению роста в свежей жидкой среде. В период хранения покоящихся форм *Mtb* периодически регистрировали способность таких микобактерий к росту как на плотных (КОЕ), так и на

жидких средах (НВЧК). Разделив значения НВЧК на КОЕ, мы смогли оценить индекс реактивации (ИР), и, таким образом, оценить количество «некультивируемых» форм в общей популяции бактерий. ИР варьировался от 10^0 (соответствует практически полностью культивируемым бактериям) до 10^8 (почти вся популяция микобактерий состоит из «некультивируемых» форм). Параллельно с периодическими высевами культуры определяли концентрацию внутриклеточного цАМФ. Было обнаружено, что существует четкая обратная корреляция между значением ИР и содержанием цАМФ в бактериальных клетках (Рис. 25), т.е. чем меньше концентрация цАМФ, тем больше «некультивируемых» бактерий в культуре. Исходя из полученных данных, можно сказать, что 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.

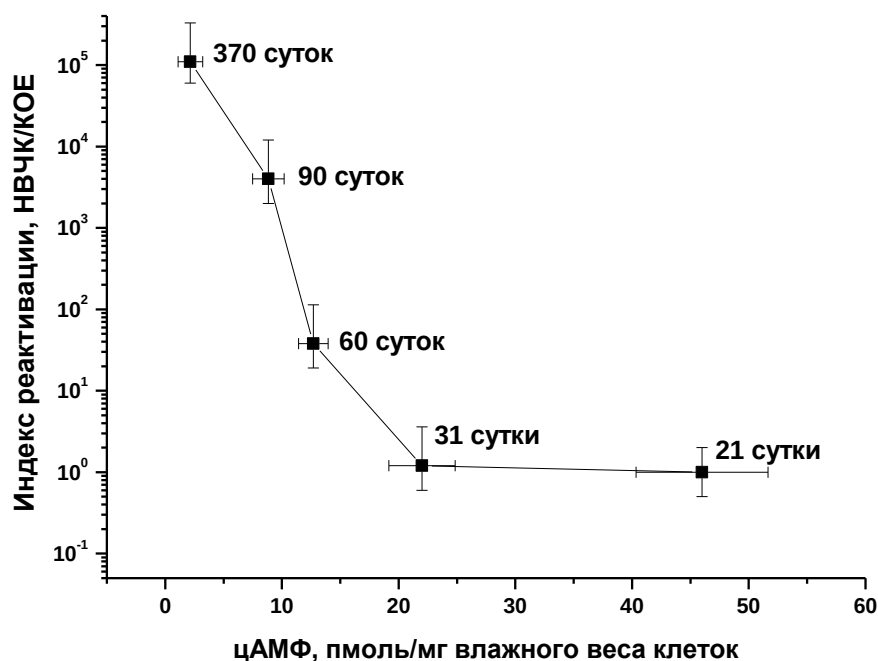
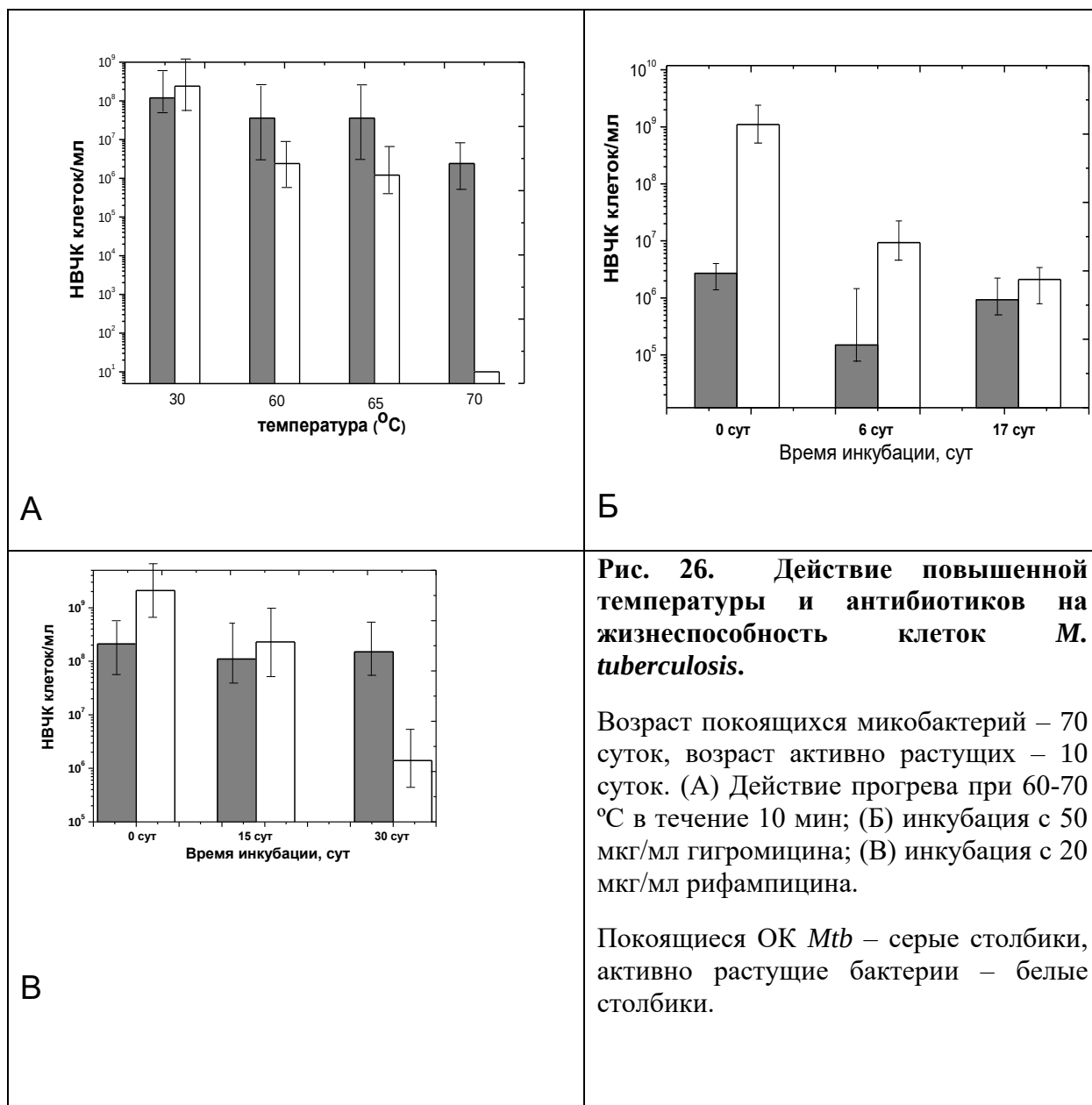


Рис.25. Индекс реактивации и содержание цАМФ при образовании и хранении покоящихся форм *M. tuberculosis*. Микобактерии выращивали и хранили в идентичных условиях для мониторинга внутриклеточных концентраций цАМФ и оценки индекса реактивации. Дни отбора проб указаны.

Овоидные клетки как патогенного, так и непатогенного штаммов микобактерий проявили повышенную устойчивость к влиянию повышенных температур, по сравнению с бактериями логарифмической фазы роста. При прогреве суспензий микобактерий при 60°C в течение 10 минут, количество РІ-отрицательных ОК *Msm* было на 20% больше, чем в случае активных палочковидных форм (Таблица 5), а по показателям КОЕ в 14 раз больше. Покоящиеся ОК *Msm* оказались устойчивее активно-растущих микобактерий и к действию антимикробных препаратов. В присутствии 100 мкг/мл гигромицина в течении 24 часов в активных и покоящихся культурах *Msm* с начальным количеством 10^8 КОЕ/мл, количество жизнеспособных для покоящихся ОК соответствовало 10^7 КОЕ/мл, а для активных палочковидных форм - 10^2 КОЕ/мл (Таблица 5).

Для овоидных покоящихся форм *Mtb* также были проведены эксперименты, направленные на оценку их устойчивости к действию повреждающих агентов. Было обнаружено, что после 70 суток культивирования в условиях закисления клетки *Mtb* приобретают повышенную устойчивость к действию повышенных температур (Рис. 26а). Количество жизнеспособных ОК после прогрева при 70°C в течение 10 мин уменьшилось всего на 1.5 порядка, а в случае активно-размножающихся микобактерий упало до нулевых значений (Рис. 26а). ОК *Mtb* оказались более устойчивы к действию антибиотиков: РИФАМПИЦИНА (20 мкг/мл) и гигромицина (50 мкг/мл) по сравнению с активно растущими микобактериями (Рис. 26б, в). Однако, в отличие от спор и цист спорообразующих микроорганизмов покоящиеся клетки микобактерий погибают в присутствии неспецифических агентов, в частности выявлено, что водорастворимые катионные нечетвертичные полиэлектролиты на основе диаллиламмония (PDAA), вторичный поли (диаллиламмонийтрифторацетат) (PDAATFA) и третичный поли (диаллилметиламмонийтрифторацетат) (PDAMATFA), обладают сильным биоцидным действием в отношении *Msm* и *Mtb*.



Были протестированы бактерицидные активности исходных солей мономеров и трифторацетата пирролидиния (PyrTFA), синтезированных для моделирования связи PDAA. Эффективность известного текущего четвертичного полимера PDADMAC (q-PDAA) с различными значениями Mw была проанализирована также для сравнения его действия с нечетвертичными PDAA; стандартные антибиотики рифампицин и ципрофлоксацин были протестированы для сравнения в аналогичных условиях. Все тестируемые соединения были предоставлены Тимофеевой Л. М. (лаборатория химии полиэлектролитов, Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева

РАН, (Москва)). Анализы активности солей мономеров DAATFA, DAMATFA и DAEATFA, а также PyrTFA и трифторацетата не показали какого-либо антимикобактериального действия даже при максимальной протестированной концентрации 500 мкг / мл. В то же время, PDAA оказывают высокий биоцидный эффект на *Msm* и *Mtb* (Рис. 27), включая «некультивируемые» покоящиеся формы последнего (Рис. 28). Четвертичный PDADMAS либо значительно менее активен, чем нечетвертичный PDAA, либо вообще не активен. Важным свойством PDAA является их эффективность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis* (Рис. 28), которая отличает эти полимеры от существующих антибиотиков, подавляющих биосинтетические процессы в бактериальной клетке. Эффективность PDAA, а именно PDAMATFA, в отношении покоящихся клеток оказалась ниже, чем в отношении клеток *Mtb* активной фазы. Активность в отношении покоящихся микобактерий указывает на то, что механизм действия PDAA на бактерии является неспецифическим и не направлен на подавление метаболических процессов клетки.

Очевидно, инактивировать покоящиеся микобактерии возможно путем применения неспецифических веществ, повреждающих структуру клетки или вызывающих модификацию внутриклеточных компонентов путем алкилирования, гидролиза, восстановления, окисления и т.д.

Таким образом, морфологически измененные овоидные формы микобактерий, полученные в условиях постепенного закисления внешней среды в длительной стационарной фазе соответствуют всем критериям, характерным для возбудителя латентного ТБ, а именно: 1) они не размножаются; 2) имеют низкую активность метаболизма; 3) устойчивы к антибиотикам (в том числе к рифампицину), подавляющим биосинтетические процессы; 4) характеризуются «некультивируемостью» на стандартных плотных средах; 5) способны к длительному хранению в условиях стресса; 6) имеют выраженные изменения морфологии; 7) способны к реактивации.

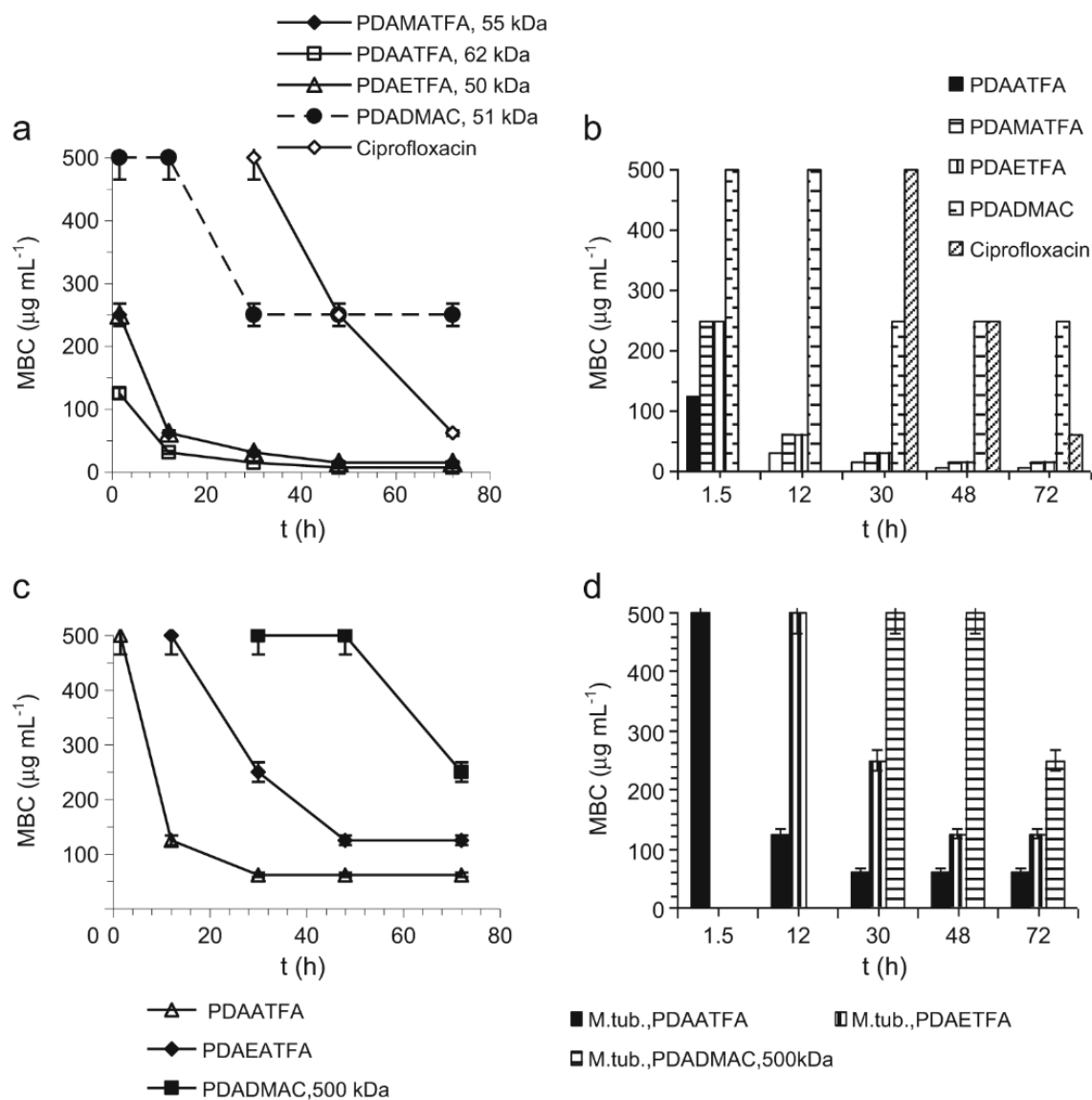


Рис. 27. Сравнение биоцидной активности (МБК) полимеров и антибиотиков в отношении *M. smegmatis* (a, b) - $3,8 \times 10^6$ КОЕ / мл: полимеры со следующими значениями M_w (PDAATFA 62 000 г моль $^{-1}$, PDAMATFA 55 000 г моль $^{-1}$, PDAEATFA 50000 г моль $^{-1}$, PDADMAC 51 000 г моль $^{-1}$) и ципрофлоксацин; и в отношении *M. tuberculosis* (c, d) - $2,0 \times 10^6$ КОЕ / мл: PDAATFA 62 000 г моль $^{-1}$, PDAEATFA 50000 г моль $^{-1}$ и чрезвычайно высокая молекулярная масса PDADMAC 500 000 г моль $^{-1}$.

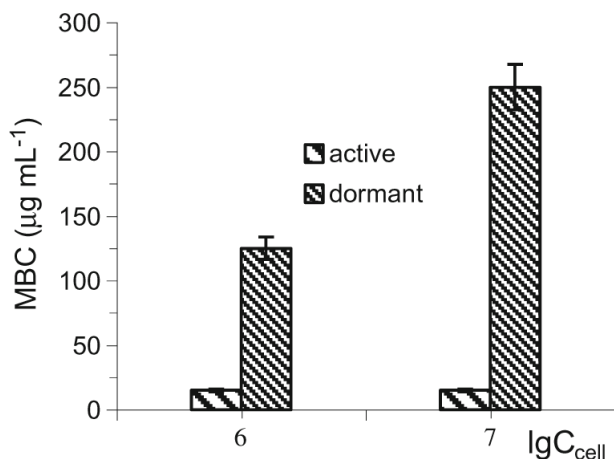


Рис. 28. Активность полидиаллиламинов в отношении *M. tuberculosis*: активные и «некультивируемые» покоящиеся клетки; PDAMATFA (55000 г моль $^{-1}$), концентрация клеток = 10^6 и 10^7 клеток / мл, 72 ч обработки

3.2.3. Характеристика запасенных веществ покоящихся микобактерий.

Исходя из описанных выше данных, в покоящихся микобактериях не происходит никаких активных биосинтетических процессов, что следует из отсутствия дыхательной активности, синтезов белка, РНК и ДНК. Допущение наличия низкого уровня метаболизма в ПМ предполагает расходование неких эндогенных метаболитов, накопленных микобактериями при переходе в состояние покоя, которые могут участвовать в поддержании минимального метаболизма покоящихся микобактерий за счет катаболических реакций. В этой связи было проведено исследование экстрагированных из покоящихся клеток *Msm* гидрофобных и гидрофильных метаболитов методом ЯМР.

3.2.3.1. Трегалоза.

Анализ низкомолекулярных компонентов водно-метанольного экстракта покоящихся овоидных форм *M. smegmatis* проводили методом ^1H - и ^{13}C -ЯМР. При сравнении полученных данных со справочными спектрами чистых веществ в стандартных растворах было выявлено значительное количество протонов, которые можно было приписать известному дисахариду – трегалозе (аномерный дуплетный протон 5.18-5.19 ppm и группа протонов в диапазоне 3,44 и 3,85 ppm) (Рис. 29а). Основным компонентом покоящихся клеток микобактерий являлась трегалоза, а меньшим компонентом - глицерин. Оба эти компонента вместе составляют, судя по интегралам протонных сигналов в спектре ^1H -ЯМР, 85% от всех протон-содержащих соединений, причем на долю трегалозы приходится соответственно около 64% от всех необмениваемых на дейтерий протонов. При ^1H -ЯМР анализе аналогичного экстракта активно растущих форм *Msm* было также выявлено наличие трегалозы, но в гораздо меньших количествах (10-15 % от всех протон-содержащих соединений). При ^{13}C -ЯМР анализе были выявлены сигналы с химическими сдвигами (ppm) - 63.2, 72.4, 73.8, 74.9, 75.2 и 96, что соответствовало литературным данным (ppm атомов углерода) для трегалозы

(аномерный C1 – 95.96, C2 – 75.215, C3 – 74.875, C4 – 73.765, C5 – 72.4, C6 – 63.246) (Рис. 29b, c).

Как будет сказано ниже, в протеомном профиле покоящихся ОК *Msm* был выявлен фермент (трегалосинтаза TreS/MSMEG_6514), участвующий в синтезе трегалозы путем конвертации мальтозы в трегалозу. Среди белков активно растущих микобактерий этот фермент не обнаружен. Что также доказывает возможность повышенного синтеза трегалозы в микобактериях в состоянии покоя.

При анализе водно-метанольных экстрактов, полученных из *Msm* разных физиологических фаз, методом ТСХ в микобактериях, находящихся в состоянии перехода в покой было выявлено пятно с $R_f = 0.87$, которое соответствовало стандарту трегалозы и в активно-растущих бактериях практически не детектировалось (Рис.30).

Таким образом, при оценке наличия трегалозы в покоящихся микобактериях методами ТСХ и ЯМР было продемонстрировано значительное возрастание количества этого дисахарида в процессе перехода бактерий в состояние покоя, при этом снижалась метаболическая активность клеток согласно данным по включению H^3 -урацила (Рис. 31). Такая повышенная концентрация трегалозы в бактериальной клетке поддерживалась свыше двух месяцев хранения покоящихся ОК *Msm*.

Существует два биосинтетических пути образования трегалозы *de novo* в микобактериях: 1) из глюкозо-6-фосфата (OtsA-OtsB путь); 2) из цитозольных α -1,4-связанных глюкозных полимеров (TreY-TreZ путь). В бактериях имеется третий путь, в котором синтез трегалозы осуществляется из мальтозы (TreS путь), но этот путь в размножающихся микобактериях практически не функционирует (Kalscheuer and Koliwer-Brandl, 2014; Miah et al., 2013). Однако, продемонстрировано, что TreS путь является важным для персистенции *Mtb* в мышцах (Murphy et al., 2005). Во время активного роста микобактерий образование трегалозы из мальтозы по пути TreS не выражено

из-за недостаточного количества синтезированной мальтозы (Miah et al., 2013).

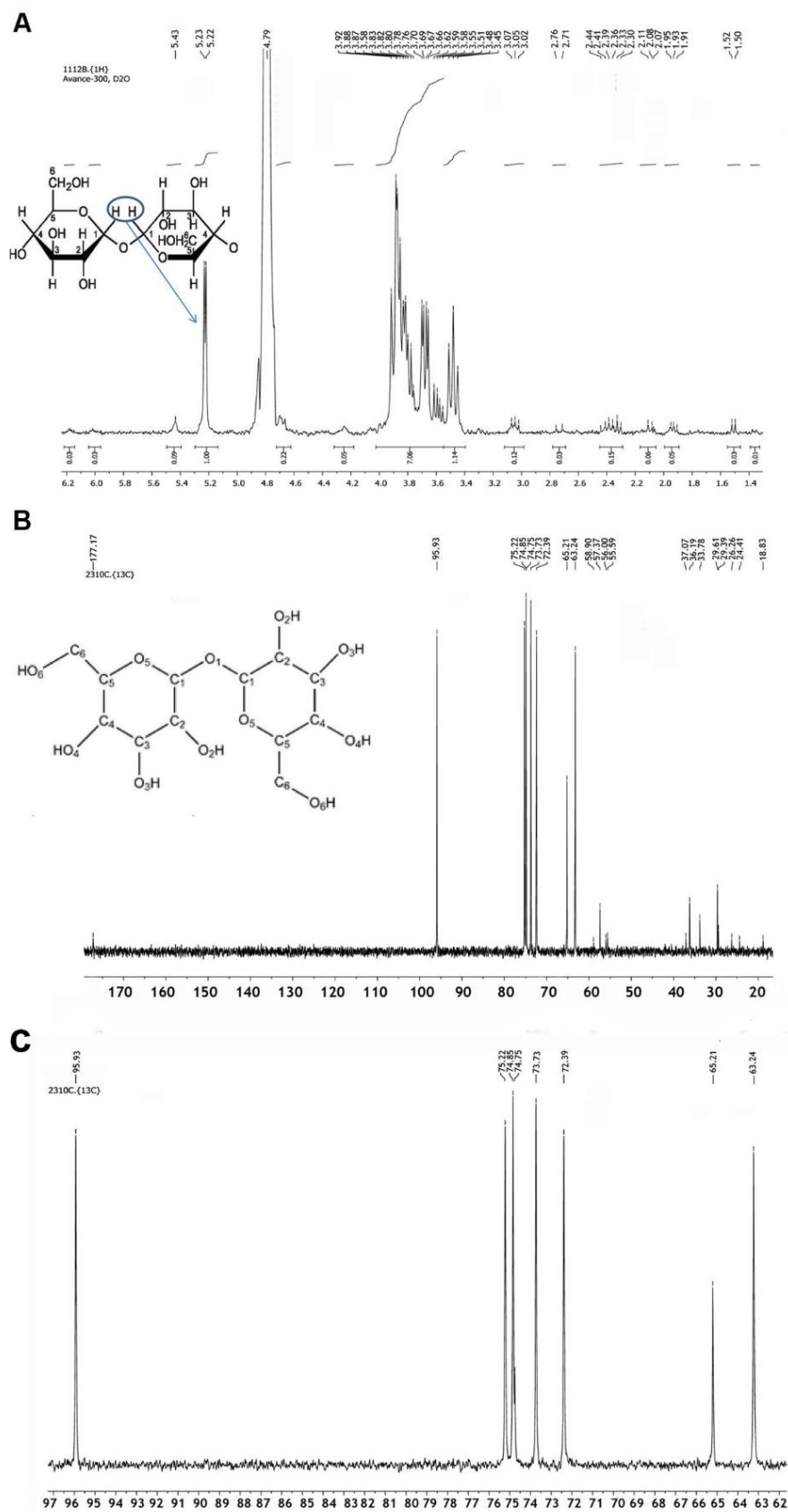


Рис. 29. ^1H -ЯМР (А) и ^{13}C -ЯМР (В, С) спектры водно-метанольного экстракта покоящихся овоидных форм *Mycobacterium smegmatis*. Сигнал на 5,18-5,19 ppm в ^1H -ЯМР спектре (А) и сигнал на 95,96 ppm в ^{13}C -ЯМР (Б) принадлежат аномерному протону и, соответственно, аномерному атому C1 трегалозы.

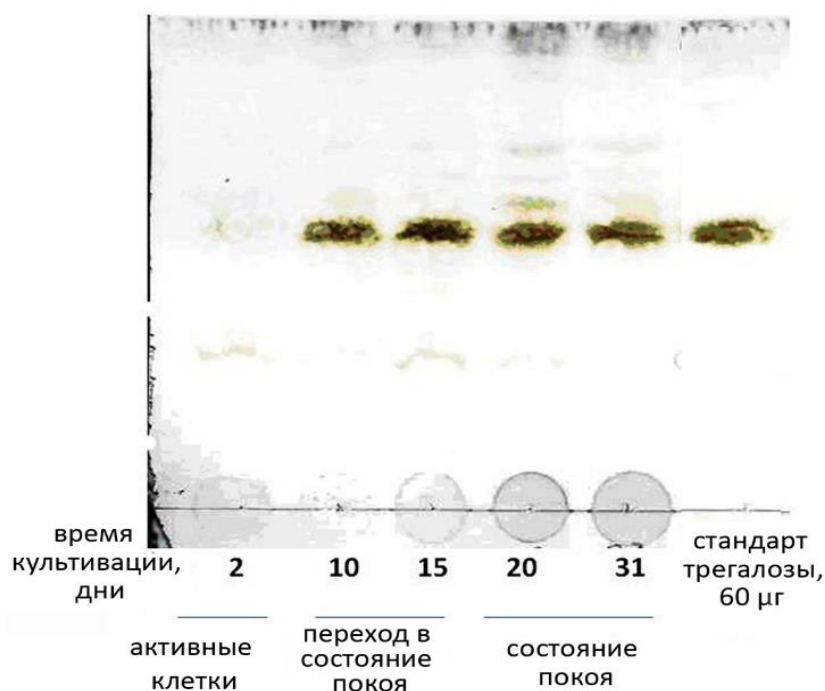


Рис. 30. Аккумуляция трегалозы в процессе перехода *M. smegmatis* в покоящееся состояние покоя. Водно-метанольные экстракты микобактерий разного возраста, растущих на среде Сотона со стартовым pH 6.0, анализировали методом ТСХ. Пластины визуализировали в 10% H_2SO_4 .

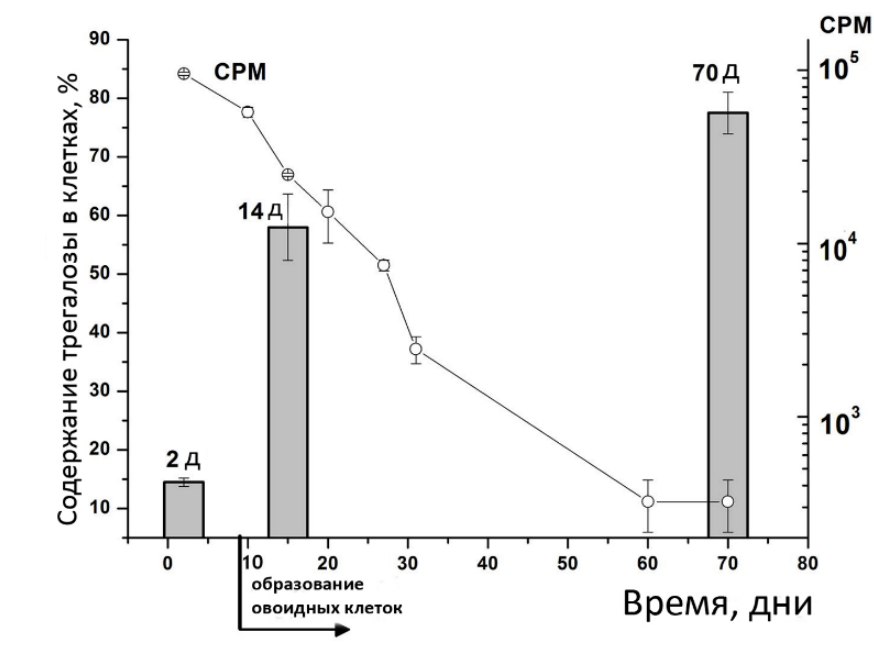


Рис. 31. Количество трегалозы в бактериальных клетках и метаболическая активность клеток *M. smegmatis* в процессе образования и хранения покоящихся

форм. Процент трегалозы был определен от всех протон-содержащих соединений по спектру ^1H -ЯМР (столбцы). Метаболическая активность оценивалась по скорости включения ^3H -урацила в клетки (СРМ) на мг влажного веса бактерий (кривая). Бары соответствуют $\pm$ стандартное отклонение.

Для выявления ведущего пути синтеза трегалозы в процессе перехода микобактерий в состояние покоя был проведен анализ экспрессии генов, участвующих в трех возможных путях синтеза этого дисахарида, методом количественного ПЦР в реальном времени. Все целевые гены хорошо экспрессировались в середине логарифмической фазы роста культуры (3 суток роста на среде Сотона со стартовым значением pH 6.0). Выделенная из этой культуры микобактерий РНК использовалась в качестве положительного калибратора для оценки относительной экспрессии исследованных генов в процессе перехода клеток *Msm* в покоящееся состояние. В бактериальных клетках, находящихся в фазе раннего стационара (4-5 суток роста), выявлено заметное увеличение уровня экспрессии всех целевых генов: экспрессия OtsA (трегалозофосфатсинтаза *MSMEG_5892*) повышалась в 3 раза, экспрессия OtsB (трегалозо-6- фосфат фосфатаза *MSMEG_3954*) увеличивалась в 2 раза на пятые сутки роста (Рис. 32). Относительная экспрессия TreY (мальтоолигозил-трегалозасинтаза *MSMEG_4696*) повышалась в 4.5 раза, в тоже время уровень экспрессии TreZ (мальтоолигозил-трегалоза трегалогидролаза *MSMEG_3184*) повышается в 16.5 раз на четвертые сутки роста (Рис.32).

Второй подъем в уровне относительной экспрессии генов OtsA-OtsB пути и TreY-TreZ пути происходит в период поздней стационарной фазы на 9-10 сутки роста и совпал с началом развития закисления культуры и переходом микобактерий в состояние покоя (Рис.32).

Поскольку относительная экспрессия TreS (трегалосинтаза *MSMEG_6514*) оставалась на низком уровне на протяжении всего процесса перехода микобактерий в состояние покоя, важность этого пути не очевидна. Однако, обнаружение продукта этого гена в протеомном профиле покоящихся микобактерий указывает на его высокую стабильность и возможность его

вовлечения в поддержание уровня трегалозы в период длительного хранения ОК *Msm*.

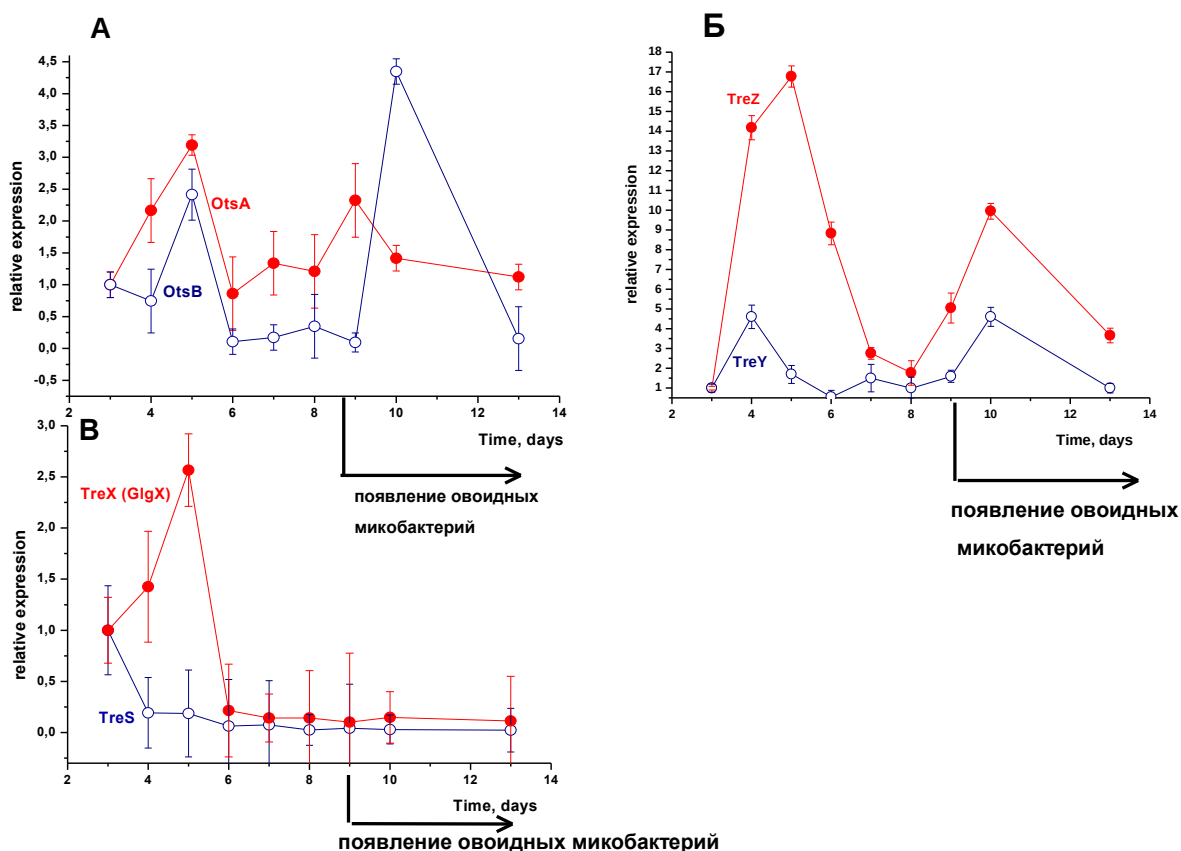


Рис. 32. Относительная экспрессия генов путей синтеза трегалозы в период перехода клеток *Msm* в состояние покоя. Данные получены по трем биологическим повторностям. Показано среднее стандартное отклонение. Уровень экспрессии каждого гена нормировали по 16S РНК. Экспрессию генов в активной фазе (3 суток роста) использовали для сравнения и приравнивали к единице. Представлена относительная экспрессия генов OtsA-OtsB пути (А), TreY-TreZ пути (Б) и TreS пути (С).

Таким образом, в период активного роста (4-5 суток) микобактерий наблюдается увеличение уровня экспрессии всех генов, включенных во все три пути синтеза трегалозы. В период развития давления стрессового фактора (закисления) и начала образования овоидных покоящихся форм наблюдается второй всплеск экспрессии генов OtsA-OtsB и TreY-TreZ путей (9-11 суток). Несомненно, что благодаря активности этих путей происходит накопление трегалозы в микобактериях в начальный период перехода в состояние покоя.

При анализе литературных данных, касающихся вопросов синтеза трегалозы в микобактериях было обнаружено, что путь OtsA-OtsB2 является

необходимым для выживания клеток *Mtb* в мышах (Murphy et al., 2005). Делеция генов TreY-TreZ пути синтеза трегалозы не оказала влияния на размножение микобактерий в организме мыши (Murphy et al., 2005). Возможно, эти два пути синтеза трегалозы являются взаимозаменяемыми в условиях *in vivo*.

Для выявления значимости запасенной трегалозы в поддержании жизненного тонуса покоящихся ОК *Msm* в период длительного хранения в условиях стресса были проведены эксперименты, в которых получали ПМ с разным уровнем внутриклеточной трегалозы. Известно, что гены, продукты которых вовлечены в биосинтез трегалозы, являются необходимыми для роста микобактерий (Woodruff et al., 2004) и их нельзя использовать в качестве мишеней для делеции. Поскольку гидролиз трегалозы контролируется ферментом трегалазой, был создан штамм *Msm*, гиперэкспрессирующий трегалазу MSMEG_4535 (штамм pES_MSMEG_4535). По данным ПЦР в реальном времени уровень трегалозы в клетках этого штамма повышался в 10 раз в период активного роста культуры по сравнению с клетками контрольного штамма, несущего пустой вектор (Рис. 33).

Микобактерии штамма с гиперэкспрессией трегалазы не имели дефектов во время активного роста культуры и были способны к формированию покоящихся овоидных клеток. При наблюдении за покоящимися клетками этого штамма в период длительного хранения было выявлено постепенное снижение концентрации внутриклеточной трегалозы до практически нулевых значений к 75 суткам (Рис.34). Одновременно с этим, в отличие от контрольного штамма, в культуре покоящихся клеток штамма с гиперэкспрессией трегалазы увеличивалось количество погибших бактерий, выявленное методами КОЕ и НВЧК, что указывает на корреляцию между концентрацией трегалозы и жизнеспособностью микобактерий в состоянии длительного покоя.

В протеомном профиле овоидных покоящихся клеток *Mtb* было также обнаружено возрастание количества ферментов, участвующих в синтезе

трегалозы (особенно Rv2006/otsB1) (Таблица 6), при этом анализ водно-метанольного экстракта клеток *Mtb* выявил увеличение содержания трегалозы в 4-5 раз в овоидных 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).

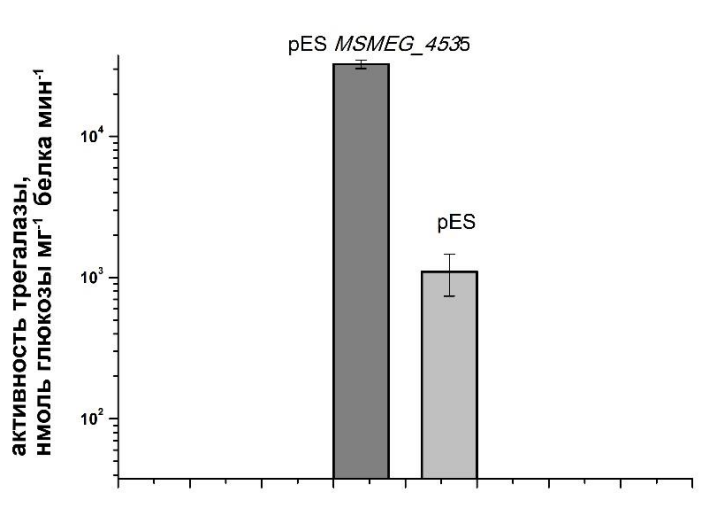


Рис. 33. Активность трегалазы в микобактериях штамма pES_MSMEG_4535 и контрольного штамма pES в период активного роста бактерий. Бары показывают стандартное отклонение.

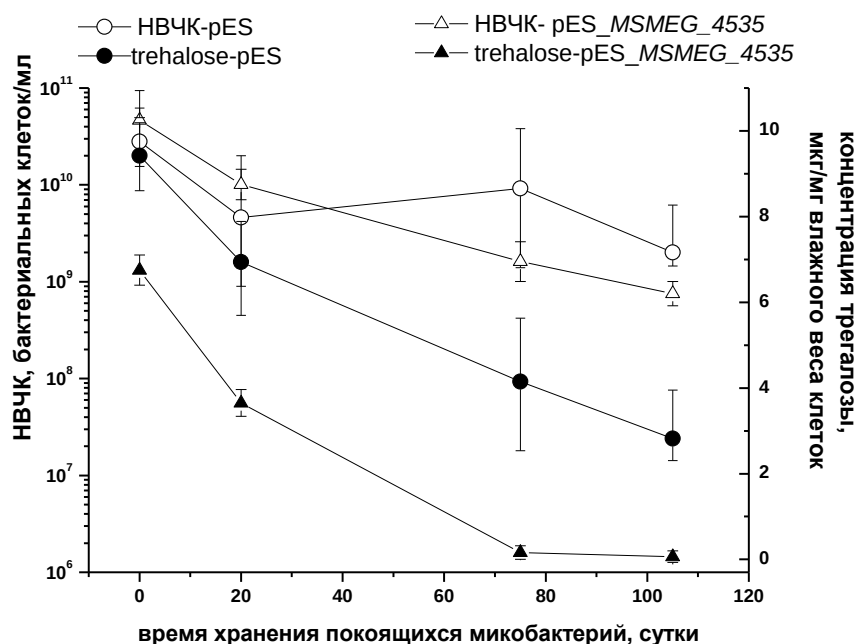


Рис. 34. Корреляция уровня внутриклеточной трегалозы с жизнеспособностью покоящихся овоидных форм *M. smegmatis* при длительном хранении микобактерий в условиях стресса. Контрольный штамм *Msm*, несущий пустой вектор pES (открытые символы). Штамм pES_MSMEG_4535 *Msm*, гиперэкспрессирующий трегалазу (закрытые символы). Жизнеспособность бактерий (кружки) оценивалась на жидких средах (НВЧК), концентрация трегалозы (треугольники) определялась методом ВЭЖХ. Представлены средние значения трех биологических повторностей.

Описание	Номер гена	Название гена	Значение для покоящихся клеток	Значение для активных клеток	значимость
delta-aminolevulinic acid dehydratase HemB	Rv0512	hemB	44.3614913094943	31.1290411124456	p>0.05
uroporphyrin-III C-methyltransferase HemD	Rv0511	hemD	96.9786602487378	379.566065920986	p<0.05
uroporphyrinogen decarboxylase HemE	Rv2678c	hemE	105.541028731146	85.3451220174165	p>0.05
glutamate-1-semialdehyde 2_1-aminomutase HemL	Rv0524	hemL	157.028591394001	581.570059571753	p<0.05
trehalose-6-phosphate phosphatase OtsB1	Rv2006	otsB1	188.670333624828	140.784344796346	p<0.05
trehalose-6P phosphatase	Rv3401	Rv3401	340.717897173549	322.143936054326	p<0.05
maltokinase Mak [Mycobacterium tuberculosis H37Rv]	Rv0127	mak	221.538414808422	365.366926408541	p<0.05

Таблица 6. Представленность белков синтеза гема и трегалозы в активных и покоящихся клетках *Mycobacterium tuberculosis*.

Согласно литературным данным, в покоящихся аскоспорах дрожжей, спорах актиномицетов и в спорах грибов, в отличие от бактериальных спор, трегалоза накапливается в значительных количествах (Arguelles, 2000; Elbein et al., 2003) и, как полагают, принимает участие в стабилизации внутриклеточных компонентов за счет образования водородных связей.

Таким образом, мы впервые обнаружили сходную черту между истинными спорами и покоящимися неспорообразующими бактериями.

3.2.3.2. Порфирины.

Другой особенностью ПМ *Msm* было накопление в больших количествах красного флюоресцирующего пигмента (как в клетках, так и в супернатанте) в процессе образования покоящихся овоидных форм на среде Сотона в условиях постепенного закисления среды до значений pH 5.7-5.8 в стационарной фазе развития культуры в течение 8-14 суток (Рис.35).

3.2.3.2.1. Анализ пигмента, накапливающегося в покоящихся клетках *M. smegmatis*.

Был проведен спектрометрический анализ супернатанта и хлороформ-метанольного экстракта покоящихся форм *Msm*. Спектры поглощения как супернатанта, так и экстракта (Рис.36) соответствовали спектрам поглощения, характерным для порфиринов (Gouterman, 1961). В супернатантах и экстрактах активно растущих микобактерий подобные спектры не детектировались (не показано).

Протеомный анализ (будет представлен ниже) *Msm* выявил значительную выраженность ферментов синтеза порфирина (порфибилиногендеаминаза/MSMEG_0953, дегидратаза дельта-аминолевулиновой кислоты/MSMEG_0956, декарбоксилаза уропорфириногена/MSMEG_2780) в покоящихся формах, в отличие от активных микобактерий.



Рис. 35. Образование пигмента в культуре покоящихся форм *M. smegmatis*.

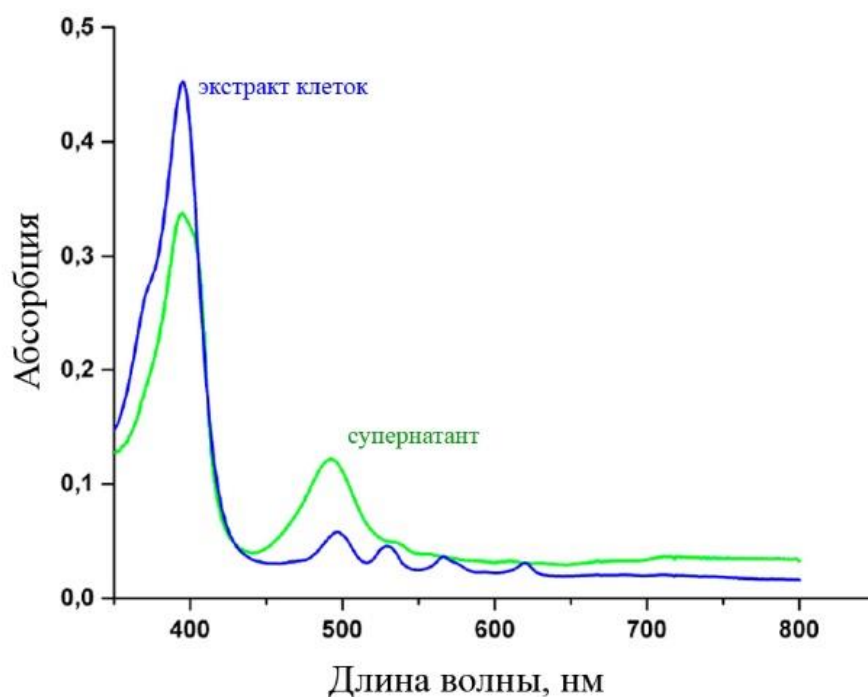


Рис. 36. Спектр поглощения хлороформ-метанольного экстракта покоящихся форм *M. smegmatis* (синий) и супернатанта (зеленый).

Для доказательства порфириновой природы обнаруженного пигмента был проведен ^1H -ЯМР анализ экстракта покоящихся ОК *Msm*. Выявленные сигналы были похожи на характерные для порфиринового кольца (Francisco, 1998) химические сдвиги сигналов: 3,3 и 4,5 ppm - протоны остатков

пропионовой кислоты присоединенные к пиролу; 3,7 ppm - CH₃ группы; 10 ppm - мезопротоны порфиринового кольца (Рис. 37).

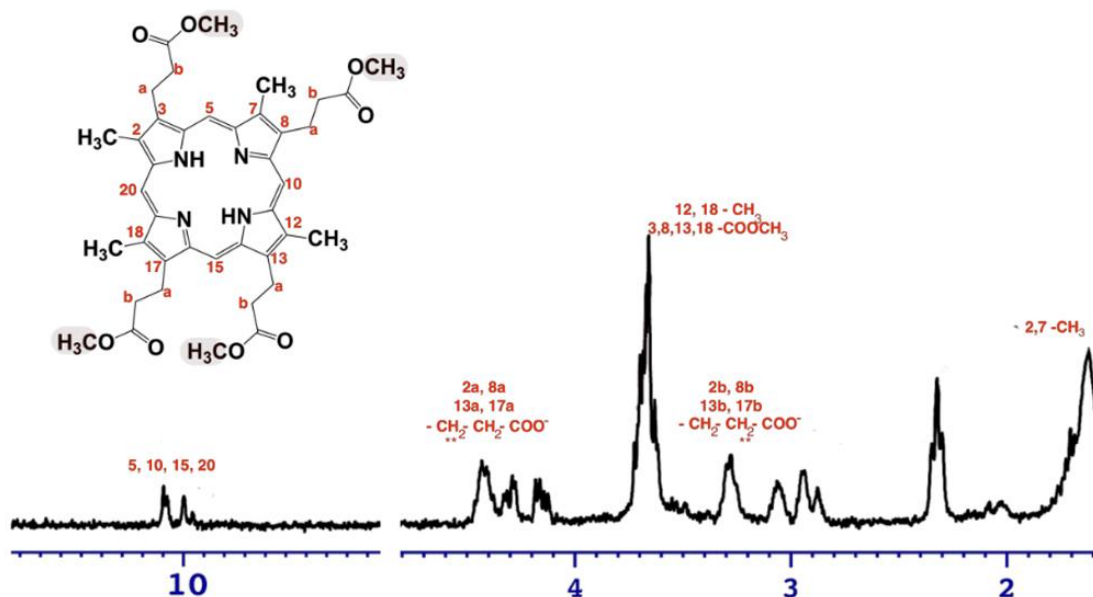


Рис. 37. ¹H-ЯМР анализ экстракта покоящихся ОК *Msm*.

Порфирины способны флуоресцировать в кислой среде при условии, если они находятся в протонированной форме и не содержат в структуре атомов железа (Gouterman, 1961).

Флуоресцентная микроскопия продемонстрировала наличие собственной флуоресценции покоящихся ОК *Msm* (Рис.38) в отсутствие каких-либо красителей, в случае активно растущих микобактерий (не содержащих порфирин) подобного не наблюдалось. На снимке видно, что флуоресценция располагается в клеточной стенке бактерий (Рис.38), что указывает на локализацию порфиринов.

Методом ВЭЖХ проанализирована динамика внутриклеточного накопления порфиринов при переходе микобактерий в состояние покоя (Рис.39). Увеличение концентрации копропорфиринов в стационарной фазе (после 6 дней роста) коррелирует с развитием постепенного закисления культуры, началом снижения метаболической активности клеток и образованием овоидных покоящихся форм, что подтверждается флуоресцентной конфокальной микроскопией (Рис. 40а, б).

Фазово-контрастная микроскопия Флуоресцентная микроскопия

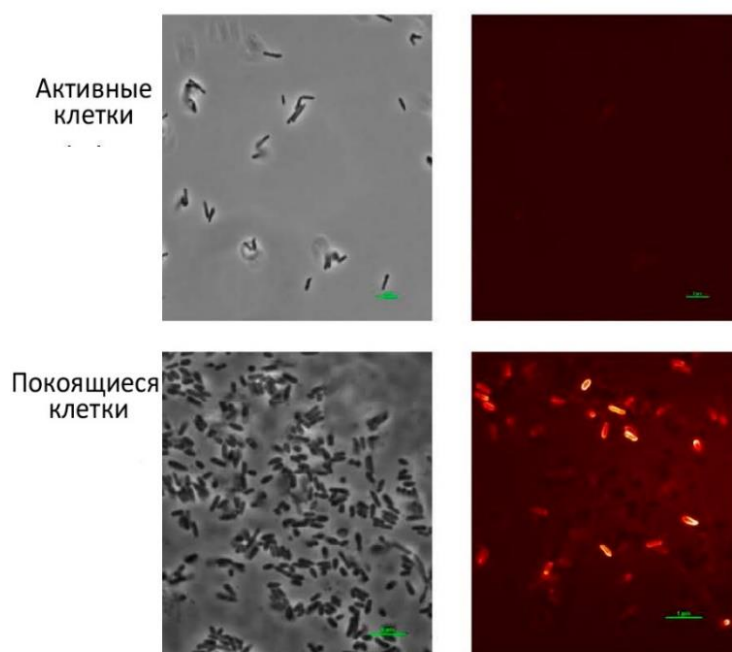


Рис. 38. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия покоящихся и активно растущих форм *M. smegmatis*.

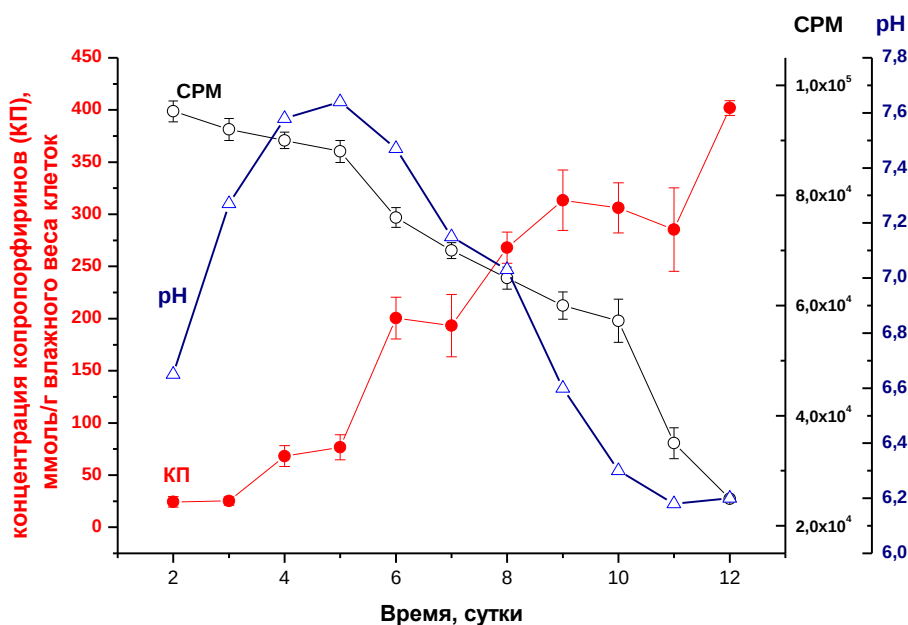


Рис. 39. Накопление порфиринов происходило на ранней стадии перехода *M. smegmatis* в состояние покоя. Клетки Msm (10^5 клеток/мл) инокулировали в среду Сотона с начальным pH 6,0. Периодически отбирали пробы для оценки pH, скорости включения H^3 -урацила (CPM) и концентрации копропорфирина. Открытые кружки - CPM, закрытые кружки - концентрация копропорфирина, открытые треугольники - pH культуры.

Накопление копропорфирина в овоидных формах (Рис. 40 Е-Н) было подтверждено с помощью микроспектрофлуориметрии. Флуоресцентный спектр одиночной покоящейся клетки *Msm*, зафиксированной в Merkoglas (Merk) соответствует флуоресцентному спектру копропорфирина (Рис. 40 С). Гистограмма среднего времени жизни флуоресценции показывает основной пик приблизительно при 8 нс, который типичен для смеси мономерного и агрегированного (димер, олигомеры) копропорфирина (Рис. 40 D) (Koenig and Schneckenburger, 1994).

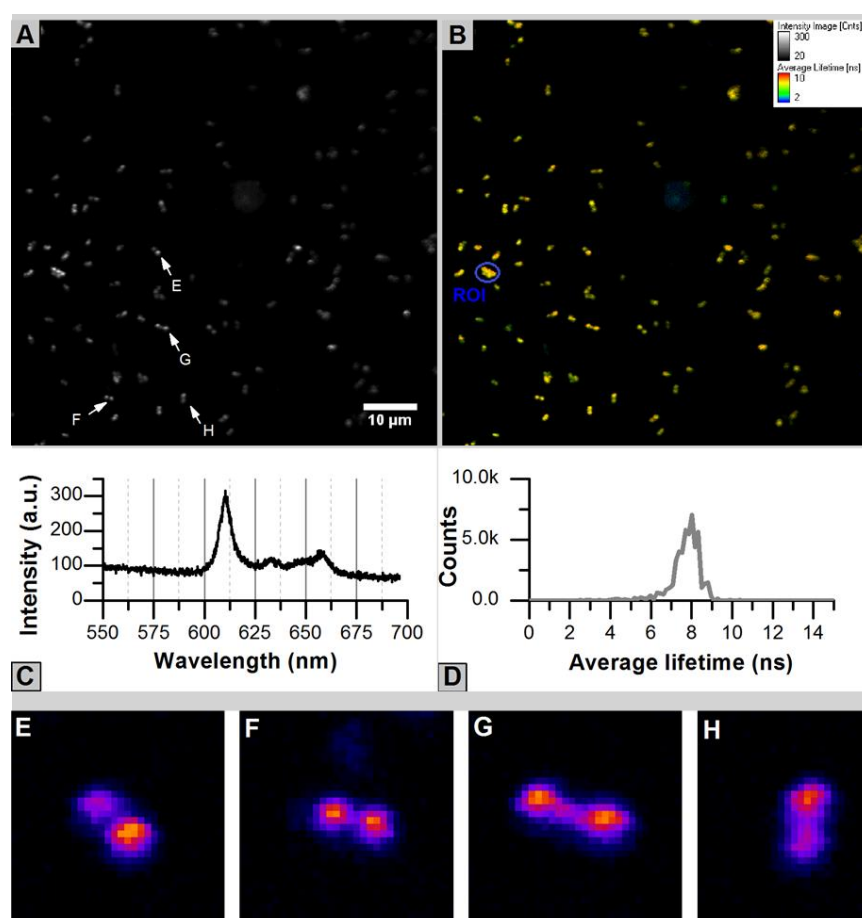


Рис. 40. Конфокальная флуоресцентная микроскопия покоящихся *M. smegmatis* при 405 нм / мкм 635/15 нм.

А – интенсивность изображения 80x80 мкм.

В – то же самое изображение FLIM с ROI (синий круг).

С – спектры флуоресценции копропорфирина из бактерий, зафиксированных в Merkoglas. Возбуждение лазером 405 нм с длинноволновым эмиссионным фильтром 550 нм. Конфокальный режим измерений.

Д – ROI среднее распределение времени жизни флуоресценции.

Е-Н – Изображения с интенсивностью 5x5 микрон с увеличенной яркостью с цветовой картой «fire» (красные области имеют более высокую интенсивность).

Известно, что порфирины, участвующие в метаболизме гема при нейтральном значении pH, являются гидрофильными водорастворимыми соединениями (за исключением протопорфирина IX, который умеренно растворим в воде). Однако в наших экспериментах мы обнаружили пигменты, выделенные из клеток в гидрофобном слое хлороформа, что позволяет предположить, что обнаруженные порфирины, вероятно, этерифицированы. Для проверки этого предположения, образец экстракта (в хлороформе) клеток подвергли мягкому гидролизу (0,5 М NaOH при комнатной температуре в течение ночи), который должен разрушить сложноэфирные связи с сопутствующим образованием свободного копропорфирина III. Действительно, после разделения фаз пигмент переходил в водный слой, отражая образование растворимого пигмента. Он может перейти обратно в слой хлороформа, если подкисляется, что указывает на протонирование свободных карбоксильных функциональных групп остатков пропионовой кислоты, прикрепленных к ядру порфирина. После подкисления ($\text{pH} < 3$) эти продукты гидролиза имели немного другие спектры поглощения и флуоресценции по сравнению со спектрами на Рис. 36, записанными при нейтральном pH: подкисленный пигмент из водной фазы имел на два пика меньше в спектре поглощения (два пика при 545 и 590 нм) и спектр флуоресценции с двумя основными пиками при 580 и 650 нм (Рис. 41а, б), что характерно для протонированной формы порфиринов.

Обработанный NaOH подкисленный пигмент был дополнительно выделен на колонке C_{18} , что позволило нам собрать пик при времени удерживания 14 мин (Рис. 42). MALDI-TOF анализ этого пика выявил наличие основного сигнала с m/z : 655,4. Эта масса точно соответствует ожидаемой молекулярной массе протонированной молекулы копропорфирина $[\text{M} + \text{H}^+] = 655,4$ (Рис. 43), что доказывает присутствие первоначально этерифицированных молекул порфирина, выделенных из клеток.

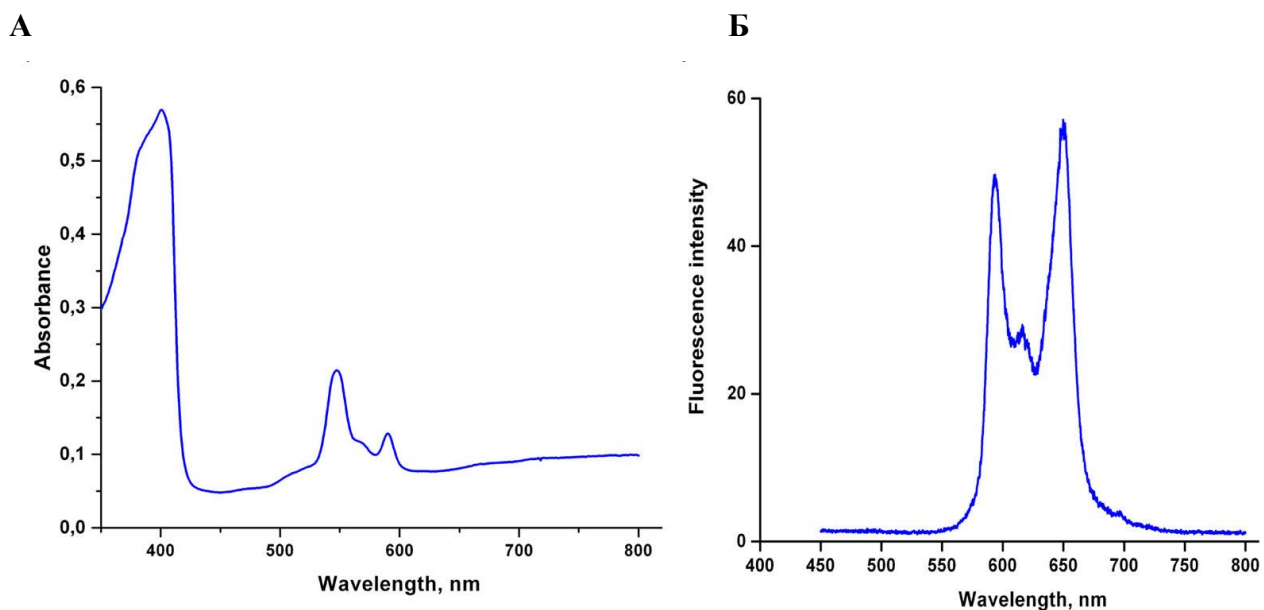


Рис. 41. Спектр поглощения (А) и спектр флуоресценции (возбуждение, 400 нм)(Б) экстракта порфиринов в кислых условиях (рН <3).

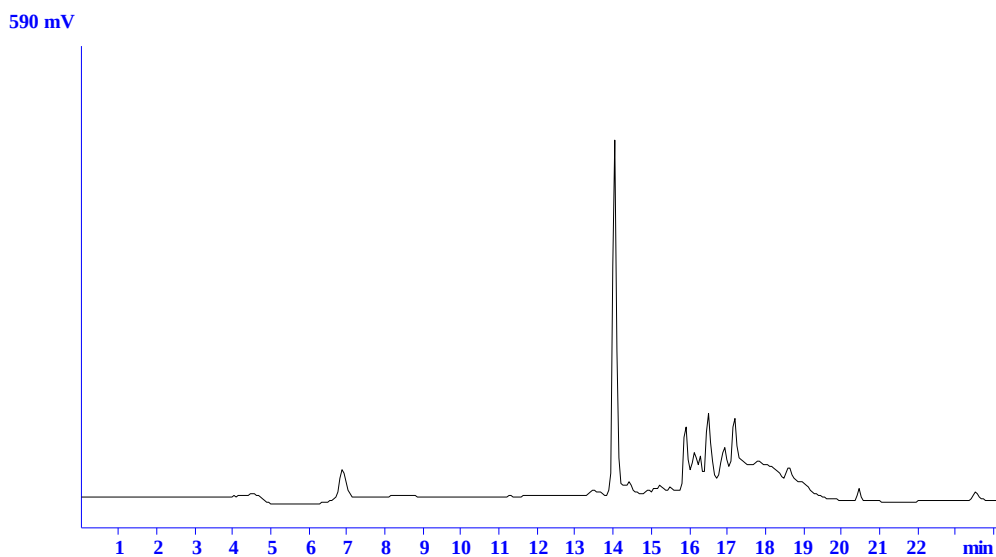


Рис. 42. ВЭЖХ подкисленной фракции порфирина демонстрирует основной хроматографический пик на 14 мин (Колонка C18 Tosoh Bioscience; градиент: 30–100% ацетонитрила; скорость элюции 1 мл мин⁻¹).

Чтобы идентифицировать конкретную сложноэфирную функциональную группу (группы), мы наносили хлороформный экстракт порфиринов на колонку ВЭЖХ C₁₈. В результате мы получили пять пиков (Рис. 44), которые были собраны и проанализированы с помощью MALDI-TOF. Различия в молекулярных массах между каждым хроматографическим пиком составляли 14 Да (Рис. 45);

наблюдаемое увеличение m/z между пиками соответствуют добавлению одной метильной группы.

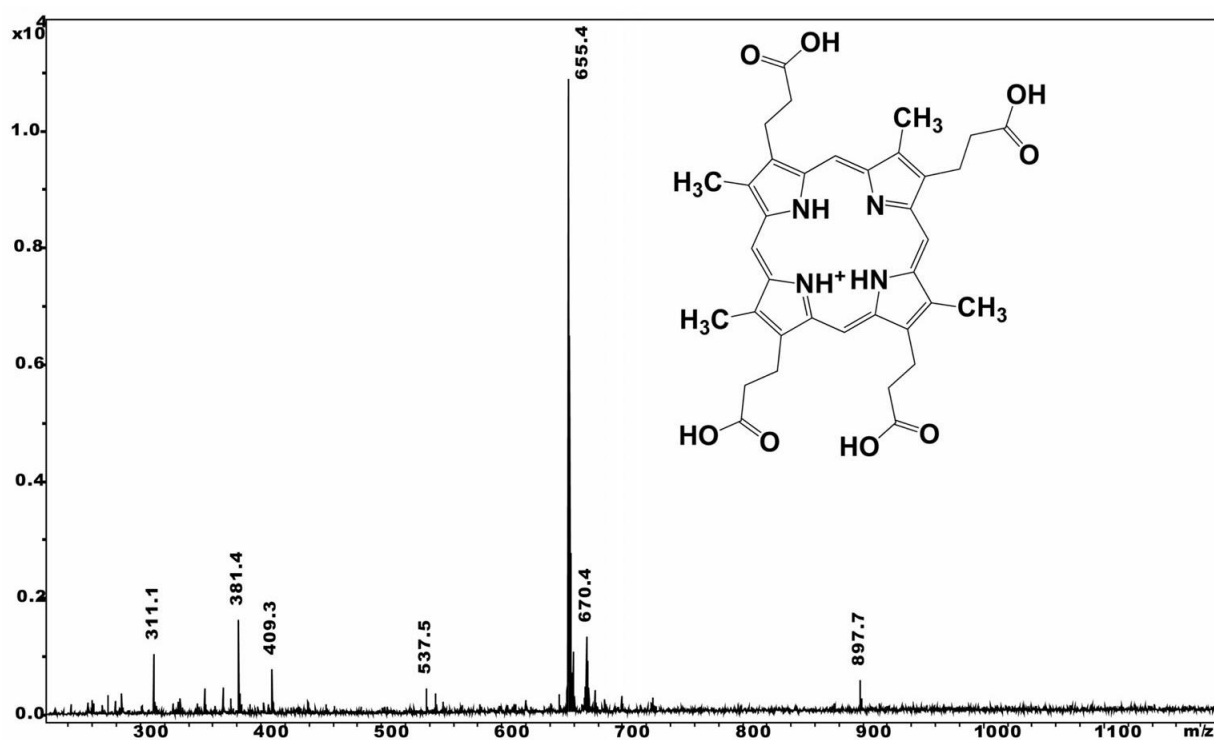


Рис. 43. Спектр MALDI 14-минутного пика ВЭЖХ $[M + H^+] = 655,4$.

436mV

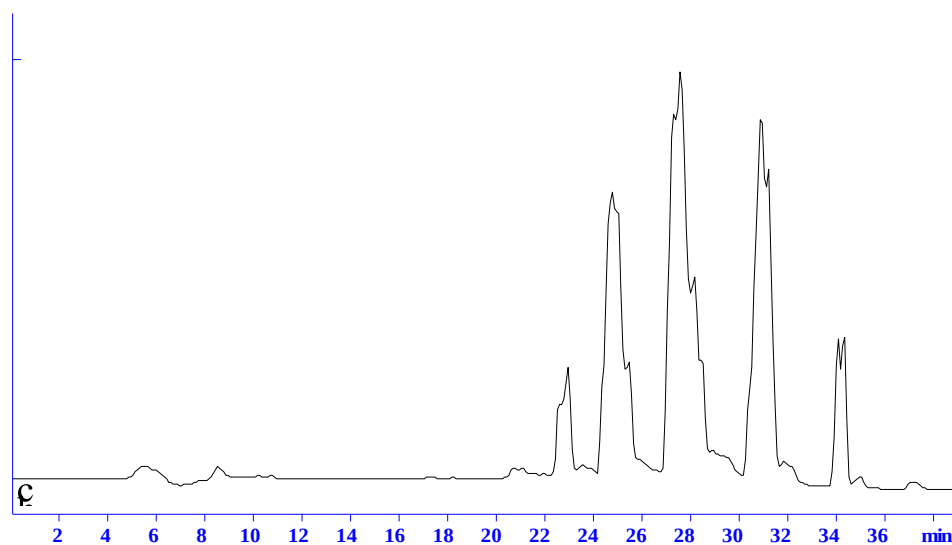


Рис. 44. Анализ хлороформно-метанольного экстракта, полученного из овоидных клеток *M. smegmatis*. ВЭЖХ демонстрирует пять хроматографических пиков (C18 Tosoh Bioscience колонка; градиент: 30–100% ацетонитрила; скорость элюции 1 мл мин⁻¹).

Следовательно, карбоксильные группы копропорфирина были этерифицированы различным числом метильных групп (за исключением соединения, сконцентрированного в первом хроматографическом пике (Рис. 44)). Таким образом, мы предполагаем, что связанный с клеткой пигмент представляет собой смесь копропорфирина и его метилированных производных.

Чтобы выяснить химическую природу пигмента, секретируемого в супернатант, мы синтетически метилировали этот пигмент с последующей его концентрацией на смоле DEAE. Спектральный анализ полученной фракции выявил ее сходство со спектрами, зарегистрированными для очищенного экстракта из микобактериальных клеток, подтверждая тетрапиррольную природу анализируемого пигмента (не показано). Анализ спектров MALDI позволил выявить пики со значениями m/z 710,33 и 942,98, которые соответствуют сложным эфирам тетраметилкопропорфирина III и октаметилуропорфирина III соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что выделяемый в среду пигмент представляет собой смесь свободных форм копро- и уропорфиринов. (*Coproporphyrin III tetramethyl ester*: MALDI-TOF: Calc. $C_{40}H_{46}O_8N_4$ – 710.33; found 711.34 $C_{40}H_{47}O_8N_4^+$ (MH^+); UV λ_{max} nm ($CHCl_3$): 400.8 (0.997), 499.2 (0.057), 533.2 (0.047), 568.4 (0.043), 621.6 (0.018); ^1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : –3.81 (2H, br, NH), 3.28 (8H, m, 4x $-CH_2CH_2COO^-$), 3.61, 3.63, 3.64, 3.65 (12H, s, 4x $-CH_2CH_2COOCH_3$), 3.67, 3.68, 3.69, 3.70 (12H, 4 x s, $-CH_3$), 4.40 (8H, m, $-CH_2CH_2COO^-$), 10.06, 10.07, 10.08, 10.09 (4H, meso protons). *Uroporphyrin III octamethyl ester*: MALDI-TOF: Calc. $C_{48}H_{54}O_{16}N_4$ – 942.98; found $C_{48}H_{55}O_{16}N_4^+$ 943.9 $C_{48}H_{46}O_8N_5^+$ (MH^+); UV λ_{max} nm ($CHCl_3$): 405.6 (0.631), 501.6 (0.053), 536.4 (0.032), 573.2 (0.021), 626.0 (0.010)).

Спектрометрический анализ хлороформной фазы хлороформ-метанольного экстракт покоящихся ОК *Mtb* выявил определенное накопление порфиринов в процессе перехода в состояние покоя (Рис.46). Расчет концентрации порфиринов в культурах *Mtb* на основе Таблицы 6 продемонстрировал, что активно растущие микобактерии содержат 0,671 мкМ порфиринов, а покоящиеся формы - 3,976 мкМ, что почти в 6 раз больше. 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. 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.

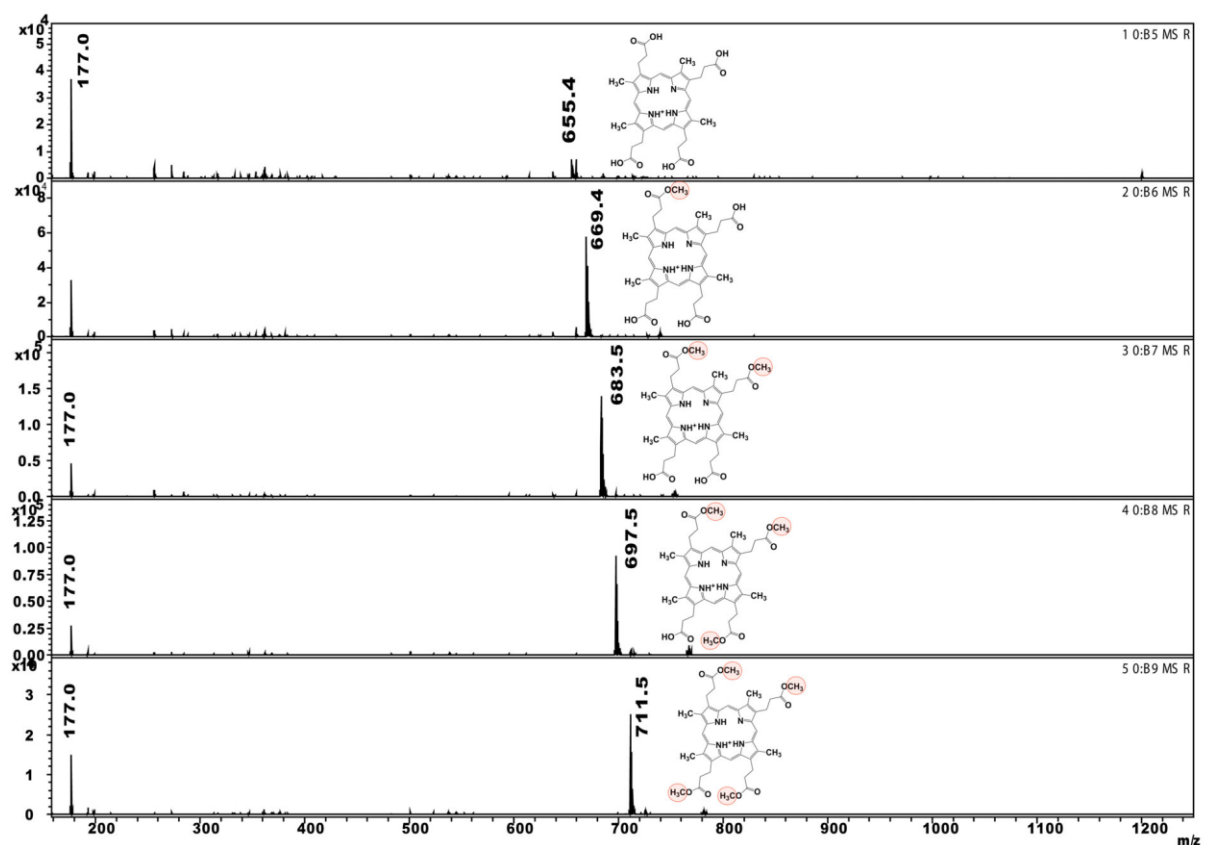
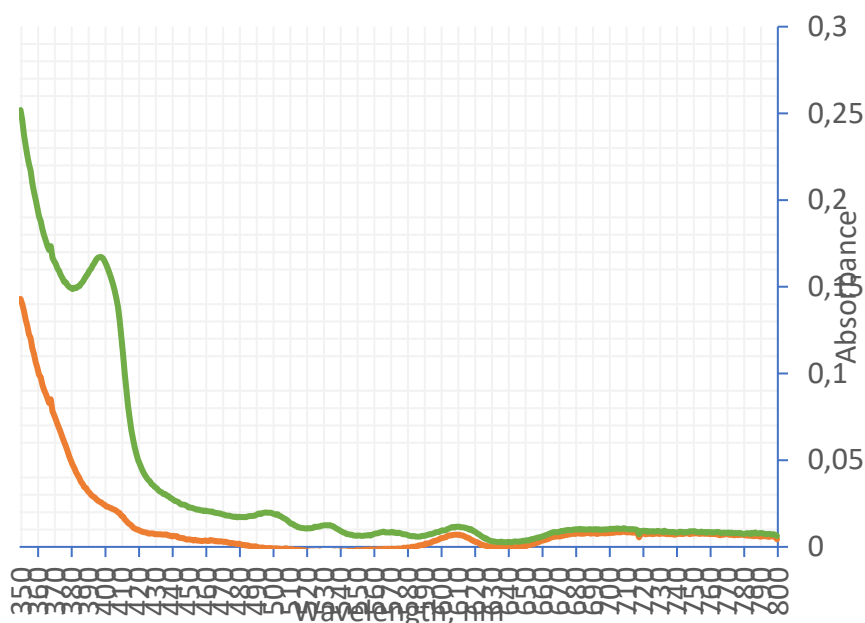


Рис. 45. MALDI-спектры пиков после ВЭЖХ соответствуют копропорфину III, этерифицированному с различным количеством метильных групп.

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



Зеленый цвет - покоящиеся *Mtb*

Красный цвет - активные *Mtb*

Рис.46. Спектр поглощения хлороформ-метанольного экстракта активных и покоящихся форм *Mycobacterium tuberculosis*.

Таблица 6. Определение концентрации порфиринов в активных и покоящихся формах *Mycobacterium tuberculosis*.

$$\varepsilon(\text{порфирин}) = (1,975 \pm 0,175) \times 10^5 \text{ см}^{-1}$$

Клетки	Масса	Объем	A	Порфирин, нмоль/г влажного веса клеток
Активные <i>Mtb</i>				
10 дней	3,5 g	15 ml	0,031	0,68 ± 0,07
Покоящиеся <i>Mtb</i>				
2,5 мес	2,1 g	10 ml	0,165	4,09 ± 0,19

В данной работе впервые тщательно исследованы пигменты, накопленные и секретируемые покоящимися микобактериальными клетками. Ранее было продемонстрировано, что в состоянии гипоксии в культурах *M. bovis*, *Mtb* (Cunningham et al., 2004) и в *Msm* (Berney and Cook, 2010) в небольших количествах накапливается пигмент неизвестной природы, структуру которого авторы не установили. В первой работе (Cunningham et al., 2004) было высказано предположение о каротиноидной структуре пигмента, а во второй (Berney and

Cook, 2010) образование пигмента связали с увеличением представленности цитохромов.

Предположительно, накопление порфиринов в покоящихся микобактериях может способствовать защите клеток от воздействия окислительного стресса, однако его роль в этих процессах пока достоверно не установлена. Тем не менее, известно, что порфирины и их комплексы с металлами, содержащие 2,6-ди-трет-бутилфенол, могут проявлять антиоксидантные свойства и участвовать в защите от активных форм кислорода и нуклеофильных соединений (Fuhrhop, 1974). Подобное явление антиоксидантного действия порфиринов продемонстрировано для эукариотических клеток (Antonova et al., 2010), митохондрий (Castello et al., 2008) и бактерий (Patel and Day, 1999). Конкретные механизмы антиоксидантного действия порфиринов пока не очевидны, но металлсодержащие порфирины структурно и, вероятно, функционально, схожи с активными центрами гем-содержащих оксидоредуктаз, участвующих в реакциях окисления органических субстратов (Antonova et al., 2010). Кроме этого, накопленные порфирины в покоящихся микобактериях могут быть использованы в качестве предшественников для биосинтетических процессов в период реактивации.

3.2.3.2.2. Фотодинамическая инаktivация покоящихся микобактерий посредством их эндогенных порфиринов.

Обнаруженное накопление эндогенных порфиринов при переходе микобактерий в состояние покоя создает предпосылки для возможной фотодинамической инаktivации (ФДИ) этих форм бактерий. Порфирины и их производные обладают следующими преимуществами среди известных фотосенсибилизаторов (ФС): 1) порфирины эффективно генерируют синглетный кислород; 2) в отсутствии света синглетный кислород не генерируется; 3) для порфиринов характерно поглощение в красной области оптического спектра; 4) они относительно стабильны. В дальнейшем была проведена экспериментальная проверка влияния фотодинамической инаktivации на жизнеспособность покоящихся форм *Msm*.

Было оценено влияние света с разными длинами волн, излучаемого четырьмя светодиодами (LED) на жизнеспособность покоящихся форм *Msm*. Наибольшая инаktivация микобактерий наблюдалась при 395 и 575 нм (Рис. 47), что совпадает с основными пиками спектра поглощения экстрагированных порфиринов (около 400 нм и 550–600 нм (Рис. 36)).

Затем мы проанализировали влияние времени воздействия света при 395 и 575 нм на жизнеспособность покоящихся и активных клеток *Msm*. При использовании светодиода 395 нм покоящиеся бактерии быстро погибали, демонстрируя падение КОЕ с 10^7 до 2×10^4 ; однако продолжающееся освещение не привело к дальнейшему снижению КОЕ (Рис. 48а).

Подобное быстрое изменение КОЕ в течение первых пяти минут освещения было обнаружено при использовании светодиода 575 нм (Рис. 48б), однако в этом случае при увеличении времени воздействия наблюдалось дальнейшее медленное снижение КОЕ.

По данным проточной цитометрии, после 30 мин воздействия светом на популяцию покоящихся форм *Msm* около 60 процентов ($58.73 \pm 4.9\%$) клеток были повреждены.

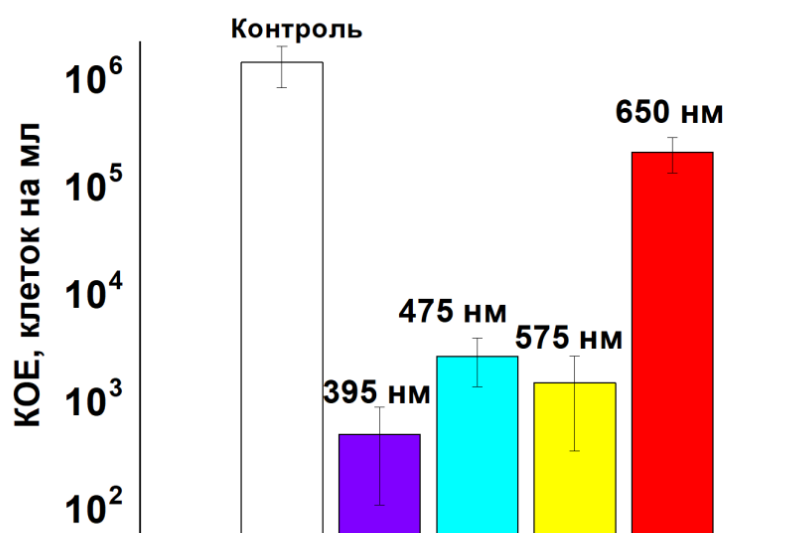
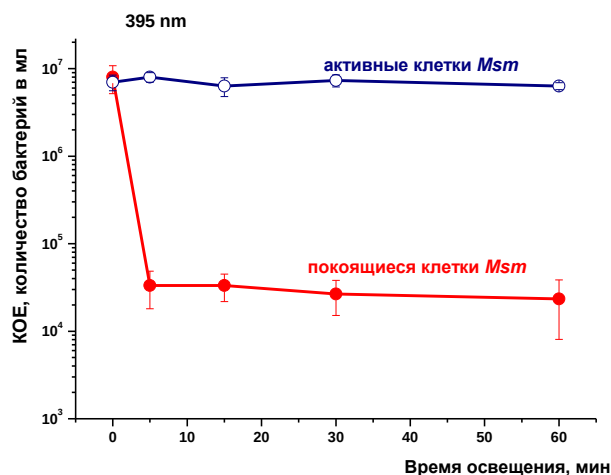


Рис. 47. Фотодинамическая инаktivация покоящейся культуры *M. smegmatis* с использованием разных длин волн. После 15 минут воздействия в статических условиях 100 мкл клеточной суспензии высевали на чашки с агаром для оценки КОЕ.

А



Б

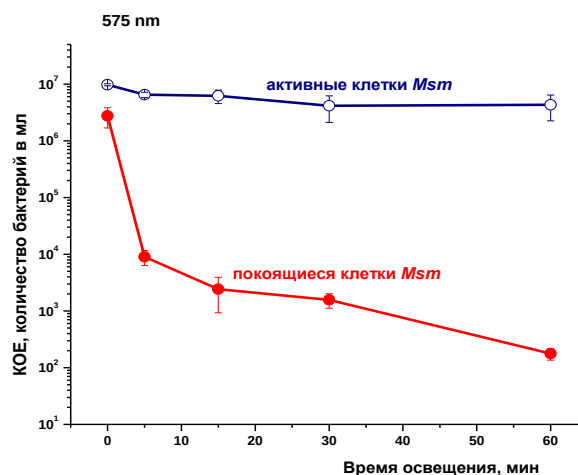


Рис. 48. Динамика фотодинамической инактивации для активных и покоящихся клеток *M. smegmatis*.

Таким образом, в данном исследовании выявлено, что освещение бактерий светом приводило к инактивации микобактерий, находящихся в стадии покоя, в противоположность активным бактериям логарифмической фазы роста.

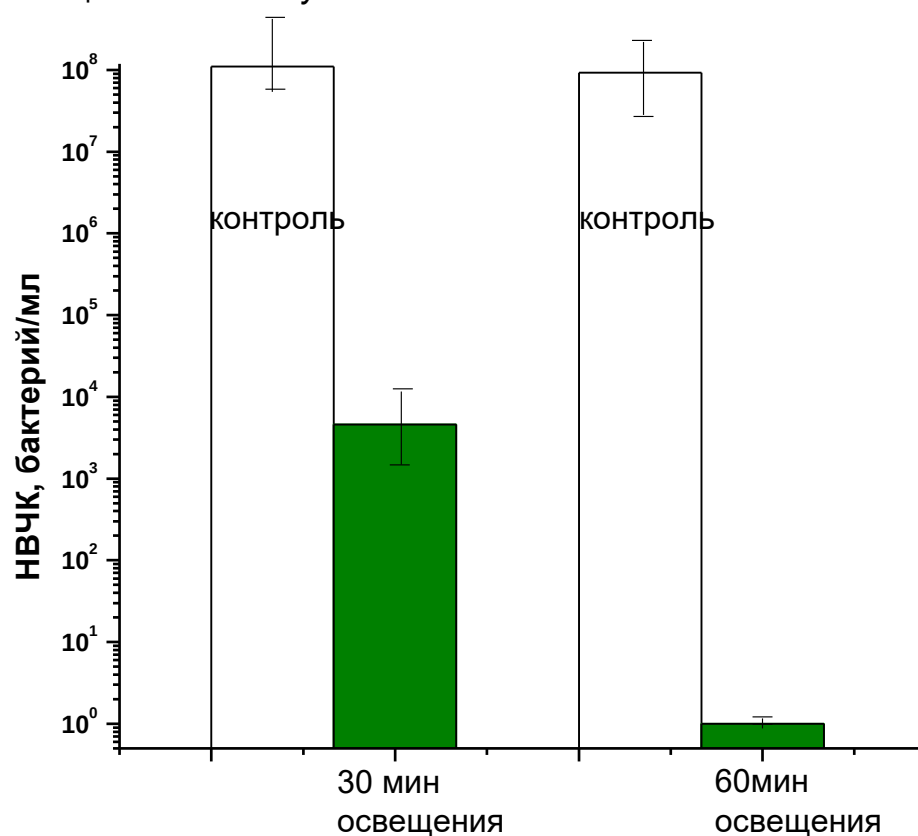
Поскольку количества образующегося порфирина в покоящихся клетках *Mtb* оказалось недостаточным для проведения эффективной ФДИ, к культурам *Mtb*, находящимся на стадии перехода в состояние покоя, для стимуляции накопления метаболитов синтеза гема был добавлен один из предшественников в цепи биосинтеза гема - 5-аминолевулиновая кислота (АЛК). Действительно, при этих условиях было выявлено накопление флюоресцирующих веществ порфириновой структуры (Таблица 8).

Таблица 8. 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	тетраметиловый эфир КП
покоящиеся	0	$0,1 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,0002$
покоящиеся + АЛК	$3,85 \pm 0,021$	$1,7 \pm 0,02$	$11,31 \pm 0,005$
активные	0	0	0
активные + АЛК	$1,65 \pm 0,12$	$2,48 \pm 0,19$	$1,42 \pm 0,1$

А

покоящиеся клетки *Mycobacterium tuberculosis* + 3 мМ АЛК



Б

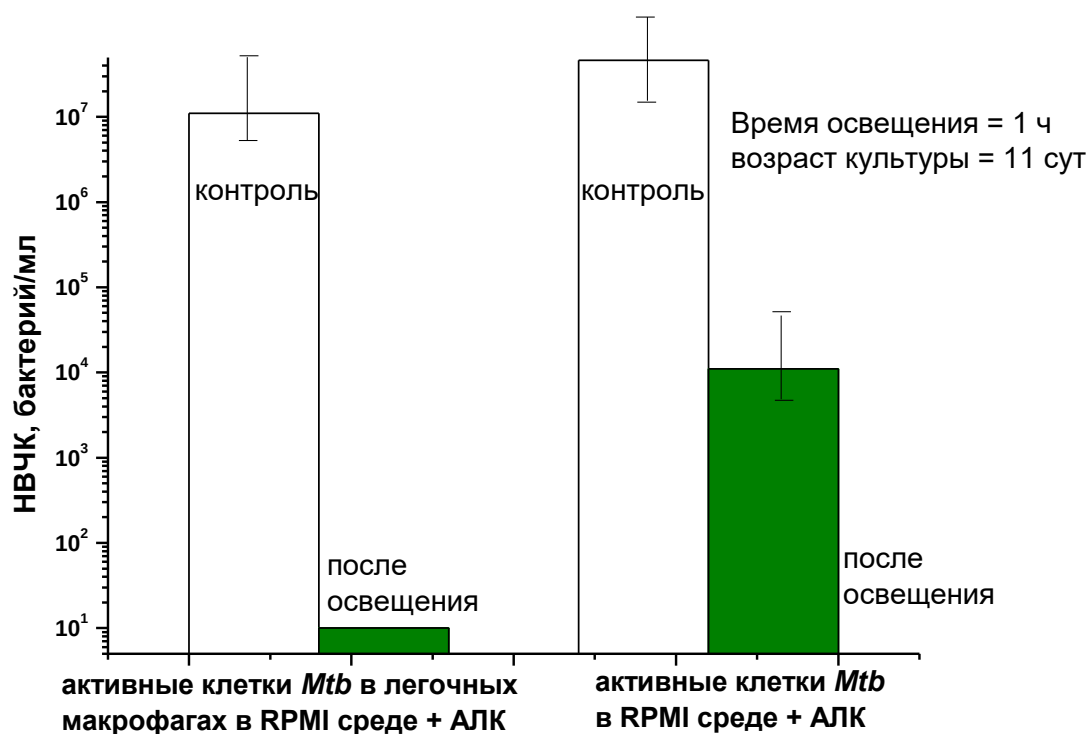


Рис. 49. Фотодинамическая инаktivация покоящейся культуры *M. tuberculosis* (А) и активных клеток *Mtb* в макрофагах (Б) при 565 нм.

Покоящиеся клетки *Mtb*, полученные в присутствии АЛК, подвергали воздействию света с длинами волн 532 нм или 565 нм, которые соответствуют поглощению порфирина, в течение 5-60 минут. Освещение бактерий лазерным лучом приводило к инаktivации покоящихся форм *Mtb* в соответствии с уменьшением количества жизнеспособных бактерий, оцененных методом НВЧК (Рис. 49а). Мы не наблюдали влияния ФДИ на активные бактерии *in vitro*, так как эти бактерии не содержат свободных порфиринов в достаточных количествах. При введении в среду роста АЛК такие клетки приобретали некоторую чувствительность к освещению (Рис. 49б).

В отдельной серии экспериментов была исследована чувствительность активных клеток *Mtb*, персистирующих в макрофагах, к воздействию света. После пребывания в течение нескольких дней активных клеток *Mtb* в макрофагах в присутствии АЛК наблюдалась значительная фотоинаktivация таких клеток (около 99,99%) (Рис. 49б), сопоставимая с действием на ПМ *Mtb*. Очевидно, что клетки, захваченные макрофагами, подвергаются воздействию стресса, что может приводить к замедлению метаболизма и накоплению порфиринов.

Впервые было продемонстрировано успешное применение ФДИ для инаktivации покоящихся клеток *Mtb* и активных микобактерий, находящихся в макрофагах, благодаря значительному накоплению эндогенных порфиринов.

Полученные результаты хорошо согласуются с работами, в которых описывается возможность использования фотоинаktivации микобактерий в основном благодаря ФС, экзогенно внесенным в культуру микобактерий. Так, Санг с соавт. продемонстрировали *in vitro* возможность фотоинаktivации штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью с использованием экзогенно добавленного ФС радахлорина (Sung et al., 2013). Ранее было продемонстрировано, что *Mycobacterium fortuitum* (Shih and Huang, 2011), *M. bovis* BCG (O’Riordan et al., 2006) и *M. marinum* (Wiegell et al., 2006), были фотоинаktivированы путем воздействия с использованием

экзогенно внесенных порфиринов *in vitro* и *in vivo*. В присутствии катионных фотосенсибилизаторов порфириновой структуры при фотоинаktivации *M. smegmatis* белым светом *in vitro* наблюдалось значительное уменьшение количества жизнеспособных бактерий (Feese and Ghiladi, 2009). Для эффективной ФДИ золотистого стафилококка в культуру бактерий вносили порфирины, имеющие связь с циклодекстрином (Hanakova et al., 2014).

Исследования, в которых применялись эндогенные ФС для фотоинаktivации бактерий, пребывающих в состоянии покоя, ранее не проводились. Выявленный нами факт аккумуляции эндогенных порфиринов при переходе микобактерий в покоящееся состояние является уникальным и расширяет горизонт для применения фотодинамической терапии по отношению к возбудителю туберкулеза.

В данной работе впервые продемонстрирована возможность ФДИ *in vitro* как активных, так и покоящихся форм микобактерий. Накопление порфиринов, а также возможность применения ФДИ на покоящихся формах микроорганизмов, включая микобактерии, ранее не изучались. Таким образом, настоящее исследование выявляет перспективу использования ФДИ для борьбы с покоящимися формами возбудителя ТБ и латентной формой заболевания.

3.2.4. Особенности протеомного профиля покоящихся микобактерий.

Для проведения протеомного анализа покоящихся микобактерий, полученных в условиях постепенного закисления внешней среды в стационарной фазе и последующего хранения без доступа кислорода (*Msm* – 1 месяц, *Mtb* – 4.5 месяца (культура «П1»), до прекращения метаболической активности, и 13 месяцев до достижения полной «некультивируемости» (культура «П2»). В качестве контроля использовали активно растущие микобактерии поздней логарифмической фазы роста (*Msm* – 2 суток роста, *Mtb* – 10 суток роста). В Таблице 8 приведена характеристика бактериальных культур *Msm*,

используемых для анализа протеомов. ОК *Msm* были метаболически неактивны, но сохраняли способность к культивированию на плотных средах (КОЕ близко к НВЧК) (Таблица 9).

Таблица 9. Характеристика активных и покоящихся клеток *Msm*.

Показатель	Активно растущие клетки	Покоящиеся ОК
КОЕ/мл.	$(2.6 \pm 2) \times 10^9$	$(1.5 \pm 1) \times 10^9$
НВЧК/мл.	$(3.6 \pm 2) \times 10^9$	$(1.1 \pm 1) \times 10^9$
Размер клеток, длина/ширина, $\mu\text{м}$	$3,43 \pm 1,05 / 0,61 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,35 / 0,55 \pm 0,08$
Синтез РНК (включение H^3 -урацила при 37°C , СРМ/мг биомассы бактерий)	21383 ± 3401	646 ± 13
Синтез РНК (включение H^3 -урацила при 25°C), СРМ/мг биомассы бактерий	6036 ± 793	30 ± 5
Активность дыхания: ДСРР восстановление ($\text{OD}_{600} / \text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$) Поглощение кислорода ($\text{нмоль O}_2 \text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$)	0.18 ± 0.01 20 ± 4.5	0.01 ± 0.005 2.5 ± 0.075
АТФ, пмоль/мг биомассы бактерий	82 ± 13	10 ± 2
цАМФ пмоль/мг биомассы бактерий	116 ± 16	28 ± 6
Рифампицин, % выживших бактерий*	0.02 ± 0.007	62.5 ± 17.8
Гигромицин, % выживших бактерий*	0.0001 ± 0.00005	10 ± 2
Бедаквилин, % выживших бактерий*	1.4 ± 0.5	30.8 ± 9.2
Количество белка, мг/г биомассы	1.9 ± 0.2	1.08 ± 0.2

* Процент микобактерий от общего числа клеток в культуре, устойчивый к действию антибиотика: гигромицина (100 мкг/мл), рифампицина (50 мкг/мл) и бедаквилина (50 мкг/мл) определяли из соотношений значений НВЧК до и после обработки.

В отличие от активно растущих микобактерий, в ОК *Msm* отсутствовали синтезы РНК и дыхательные процессы, в связи с чем наблюдалась их значительная устойчивость к действию антибиотиков, ингибирующих синтез РНК (рифампицин), белка (гигромицин) и активность АТФазы (бедаквилин) (Таблица 9).

Анализ с помощью флуоресцентной микроскопии и индикатора мертвых бактерий пропидиума иодида выявил в популяции покоящихся клеток *Msm* 60 % интактных (Рис. 50), сильно отличающихся по морфологии от активно растущих палочковидных форм.

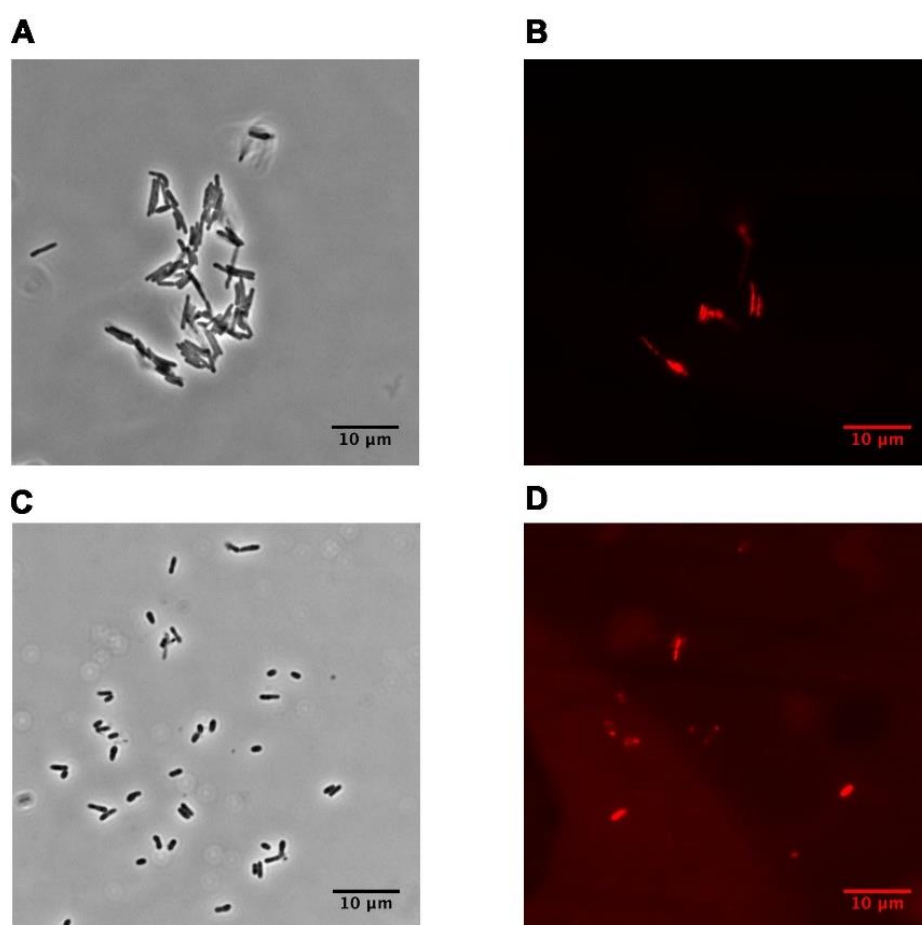


Рис. 50. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия культур *M. smegmatis* (увеличение $\times 1500$): А, В – активно растущие бактерии поздней логарифмической фазы роста; С, D – покоящиеся ОК после 1 месяца хранения в статических условиях. А, С – фазово-контрастная микроскопия, В, D – флуоресцентная микроскопия бактерий, окрашенных с помощью иодида пропидиума для выявления погибших клеток. Бар на каждой фотографии соответствует 10 мкм.

В Таблице 10 приведены основные характеристики культур *Mtb*, которые использовали для проведения анализа протеомных профилей. Поскольку в культуре наблюдалось появление крупных агрегатов, состоящих из мертвых клеток, была проведена процедура отмывки ОК *Mtb* от мертвых бактерий при помощи фосфатного буфера, содержащего 0.85 г/л NaCl (см. п. 3.2.). Полученные фракции культур (Рис. 51) использовали для анализа белков. Обнаружено, что в пересчете на мг влажной биомассы микобактерий, В ОК *Mtb* содержится меньше общего белка (особенно во фракции мембран), чем в мг активно растущих клеток (Таблица 10).

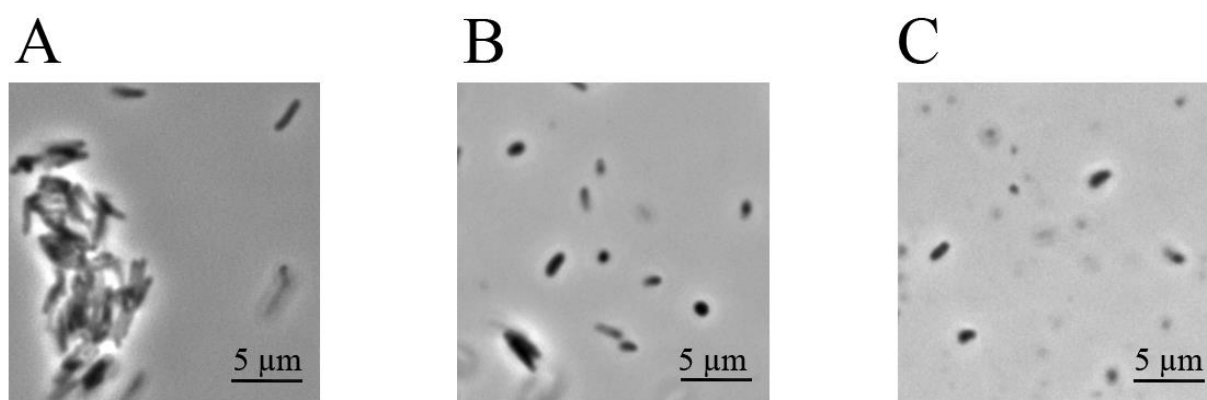


Рис. 51. Фазово-контрастная микроскопия культур *M. tuberculosis*: А – активно растущие клетки ранней стационарной фазы; В – покоящиеся ОК после 4.5 месяца хранения в статических условиях; С – покоящиеся клетки после 13 месяцев хранения в статических условиях. Бар на каждой фотографии соответствует 5 мкм.

ОК *Mtb* характеризовались отсутствием способности расти на плотных средах (КОЕ в состоянии П1 - 10^4 клеток/мл, в состоянии П2 – ноль), в то же время значение НВЧК было довольно высоким (НВЧК в П1 – 10^8 клеток/мл, в П2 – 10^6 клеток/мл). ОК *Mtb* как в состоянии П1, так и в состоянии П2 характеризовались низким уровнем внутриклеточного цАМФ, отсутствием синтезов РНК, белка и активности дыхания (Таблица 10).

В микобактериях содержится большое количество сложных липидов (например, разветвленных миколовых кислот), что создает трудности для экстракции белков и их последующего разделения в условиях 2Д электрофореза.

Таблица 10. Характеристика активных и покоящихся клеток *M. tuberculosis*

Показатель	Активно растущие микобактерии	ОК после 4.5 месяцев хранения (П1)	ОК после 13 месяцев хранения (П2)
КОЕ/мл	$(5 \pm 2) \times 10^7$	$(1 \pm 0.5) \times 10^4$	0
НВЧК/мл	$(1.2 \pm 3) \times 10^8$	$(9.3 \pm 4) \times 10^7$	$1.5 \pm 2.2 \times 10^6$
Размер клеток, длина/ ширина, мкм	2.5±0.4/ 0.4 ±0,02	0.9±0.1/ 0.6 ±0,04	0.9±0.3/ 0.5 ±0,08
Синтез РНК (включение H^3 -урацила, СРМ/мг влажного веса клеток)	3623±52	0	0
Синтез белка (включение ^{14}C -аспарагина, СРМ/мг влажного веса клеток)	340±20	0	0
Активность дыхания: восстановление ДСРІР, нмоль ДСРІР /мин/ мг клеток	0.11±0.03	0.016±0.003	0
цАМФ, пмоль/мг влажного веса клеток	124±4	2±1	0
Количество общего белка во фракции цитозоля, мг/г влажного веса клеток	3.6±0.2	2.13±0.2	2.55±0.2
Количество общего белка во фракции мембран, мкг/г влажного веса клеток	76.2±5	39±5	20.7±5

В ОК микобактерий наблюдается увеличение толщины клеточной стенки и сдвиг соотношения белок/липид в сторону липидной составляющей, что потребовало проведение работы по выбору методов экстракции белков из таких клеток и условий проведения электрофореза. Клетки микобактерий были разделены на цитозольную и мембранную фракцию, что позволило подобрать условия для наилучшей экстракции как гидрофильных белков, так и гидрофобных (из мембран).

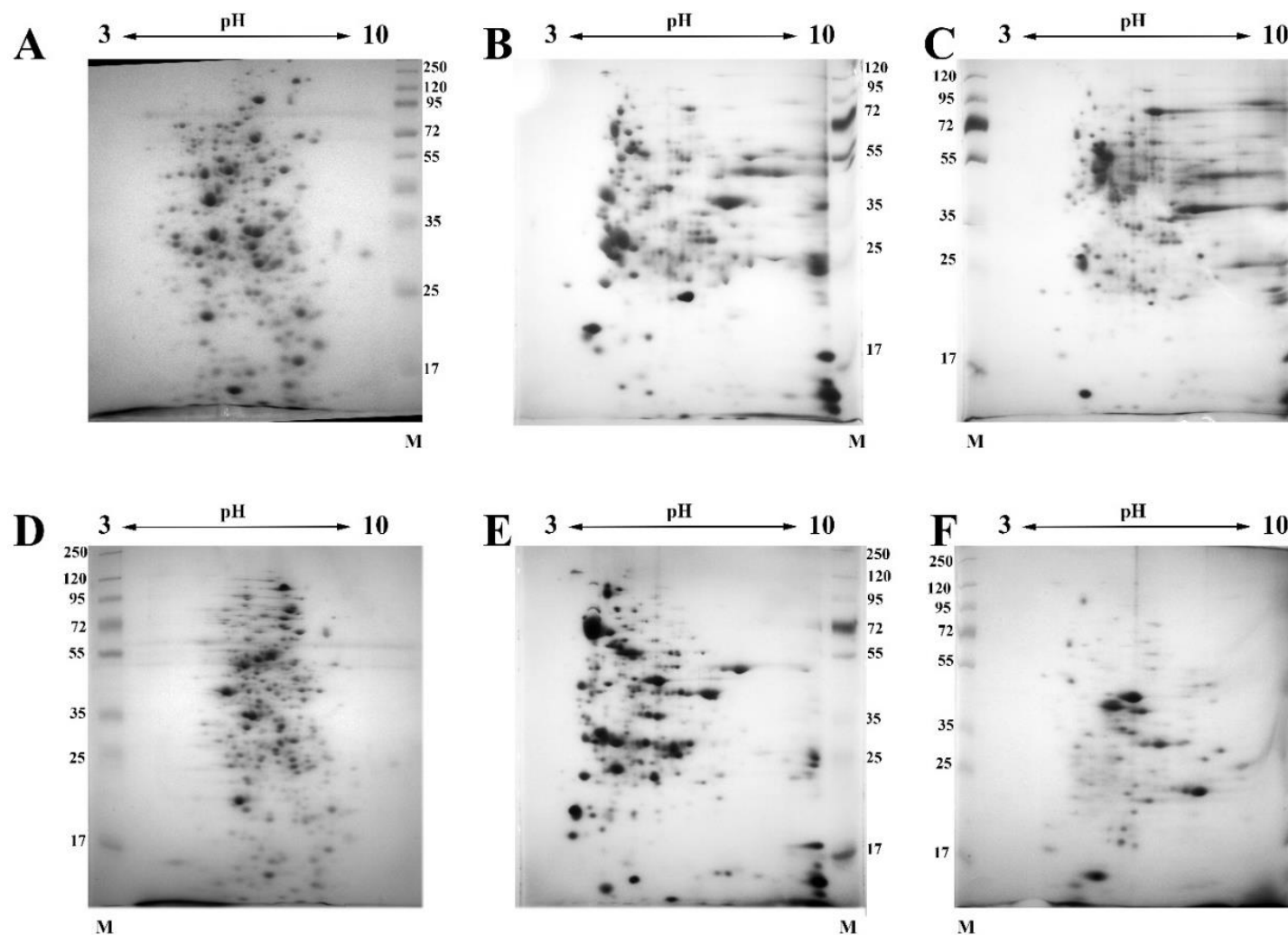


Рис. 52. 2Д-электрофореграммы активно растущих и покоящихся форм *M. smegmatis*. А, В, С – активно растущие клетки, поздняя логарифмическая фаза роста; D, E, F – покоящиеся ОК (1 месяц хранения). А, D – фракции цитозоля; В, Е – CHAPS – экстракт фракции мембран; С, F – SDS - экстракт фракции мембран.

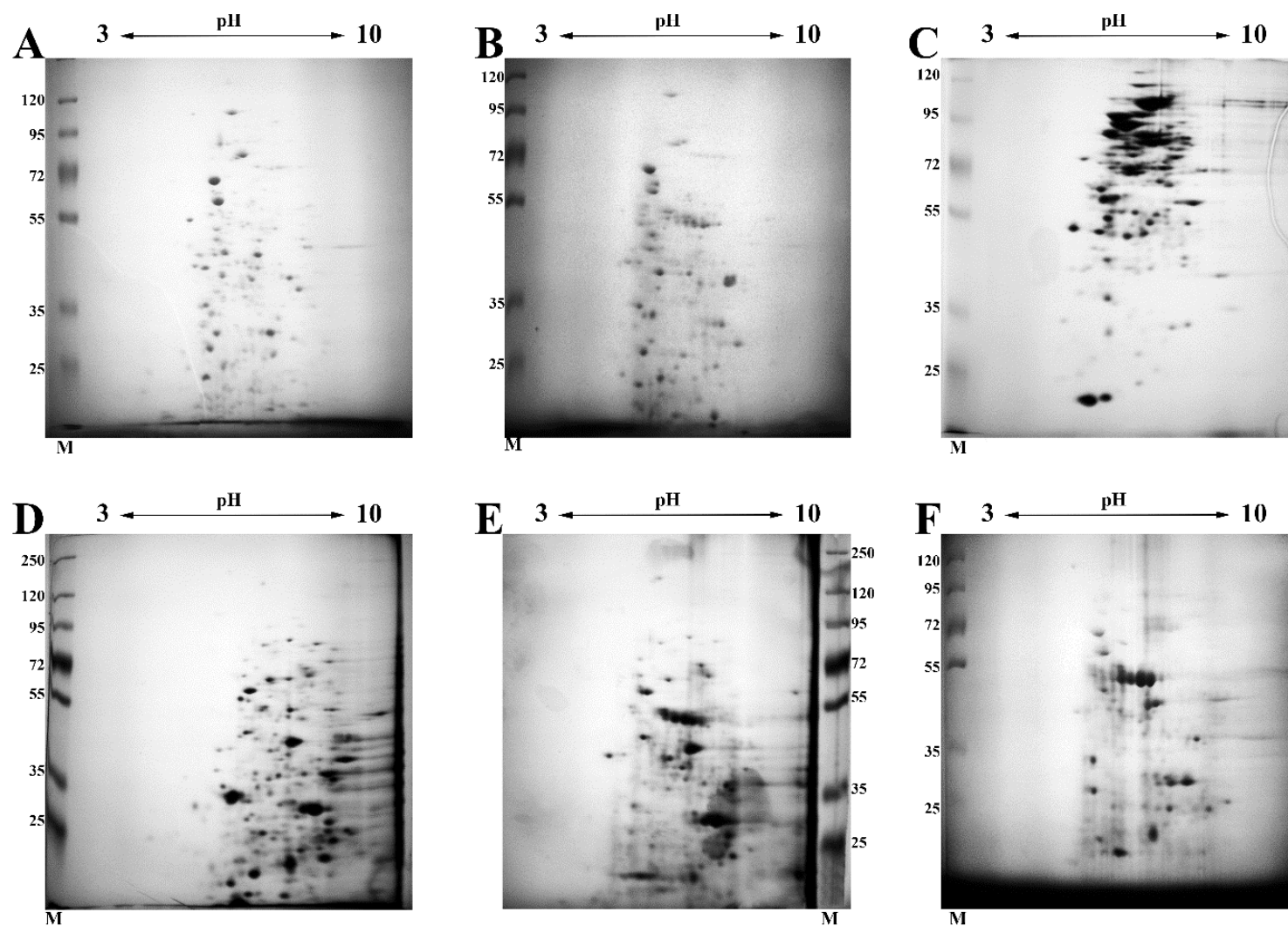


Рис. 53. 2Д-электрофореграммы активно растущих и покоящихся форм *M. tuberculosis*. А, D – активно растущие клетки, поздняя логарифмическая фаза роста; В, Е – покоящиеся ОК (4.5 месяцев хранения) П1; С, F - покоящиеся ОК (13 месяцев хранения) П2. А, В, С – фракции цитозоля; D, E, F – SDS - экстракт фракции мембран.

Несмотря на то, что количество экстрагируемого белка отличается в разных типах клеток (Таблица 10), для проведения 2Д электрофореза использовали одинаковую концентрацию общего белка для всех вариантов микобактерий. В этом случае приведение количества отдельных белков к массе микобактерий не отражает реального положения дел, и оценка представленности белка была проведена аналогично методу, используемому при анализе транскриптома в случаях, когда общая концентрация мРНК значительно отличается между активными и покоящимися микобактериями (Salina et al., 2009). Этот подход заключается в денсиметрической оценке белковых пятен с последующим ранжированием белков по их представленности в протеомном профиле конкретного типа микобактерий. Такой подход позволяет охарактеризовать представленность белков конкретных метаболических путей, несмотря на разное содержание общего белка между активно растущими и покоящимися микобактериями.

В итоге были получены 2Д-электрофореграммы белков цитозольной и мембранной фракций активно растущих и покоящихся клеток *Msm* (Рис. 52) и *Mtb* (Рис. 53) после последовательного окрашивания коллоидным Кумасси и серебром. Каждое пятно было вырезано из геля и идентифицировано MALDI-TOF анализом с последующим поиском в базе данных MASCOT.

3.2.4.1. Характеристика представленности белков в активно растущих и покоящихся формах *M. smegmatis*.

Было исследовано 726 белковых пятна в активно растущих и покоящихся формах *Msm*, среди них было идентифицировано 586 индивидуальных белков, аннотированных в базе данных “Smegmalist” (<http://svitsrv8.epfl.ch/mycobrowser/smegmalist.html>). Содержание разных белков в пределах одного пятна колебалось от 1 до 4. В активно растущих формах выявлено 364 белка, в покоящихся ОК – 351 белок (Приложение 1). Из них около 170 белков оказались общими для двух типов микобактерий, это меньше, чем 50 % от протеома каждого типа, что отражает значительную разницу в протеомных

профилях активно растущих и покоящихся ОК *Msm* (Рис. 54). При этом интенсивность представленности этих «общих» белков в протеомном профиле каждого типа клеток существенно отличалась (Приложение 1).

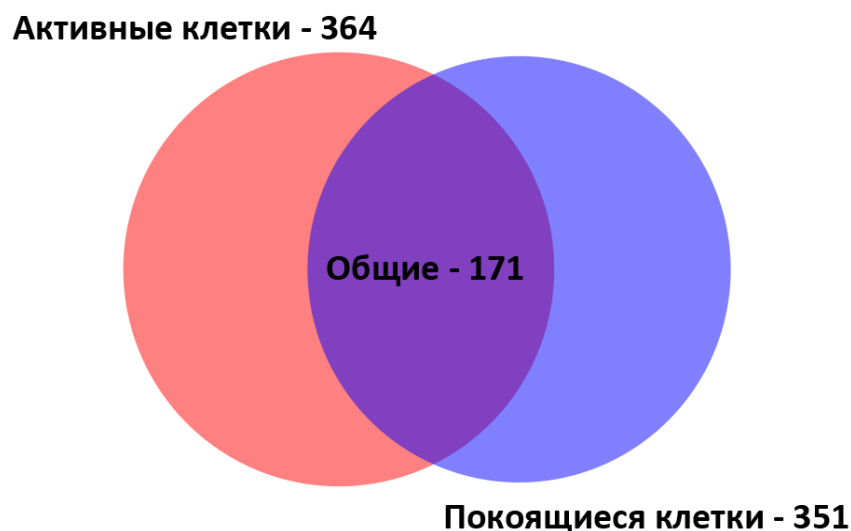


Рис. 54. Диаграмма Венна, отражающая перекрывание белков между протеомным профилем активно растущих и покоящихся овоидных клеток *M. smegmatis*.

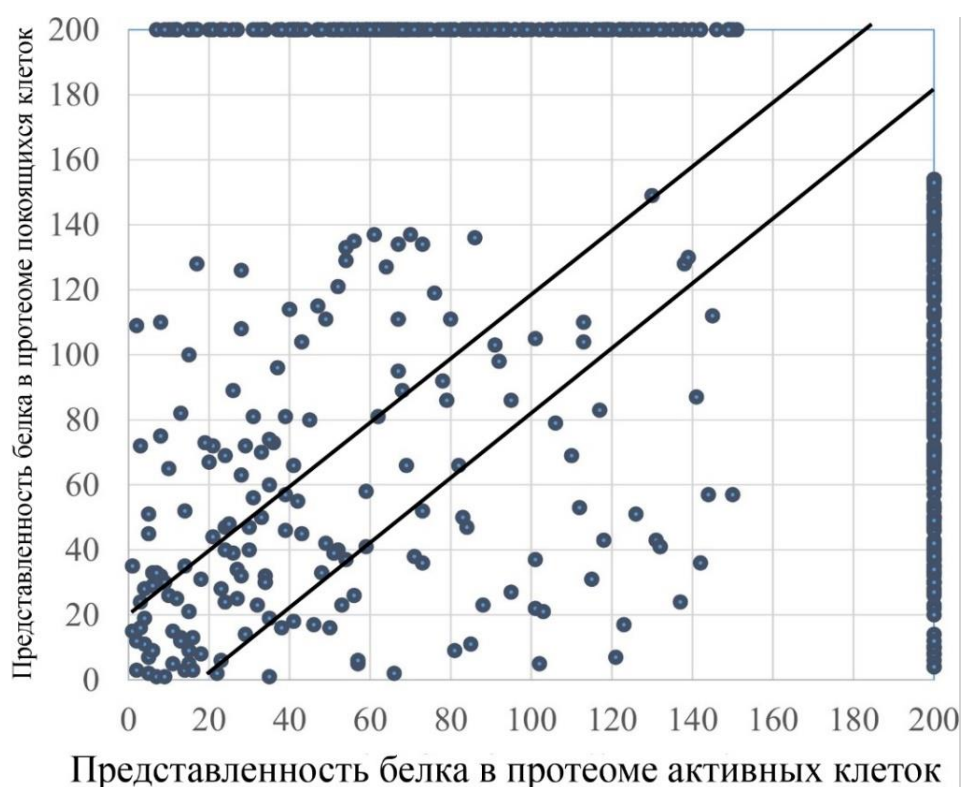


Рис. 55. Относительная представленность белков активно растущих и покоящихся клеток *M. smegmatis*. Распределение белков проводили в соответствии местом белка в протеоме каждого типа клеток, присвоенного с учетом денситометрического показателя белкового пятна, от самого представленного (1 место) до наименее представленного (154-й номер для активно растущих и 151 для покоящихся клеток).

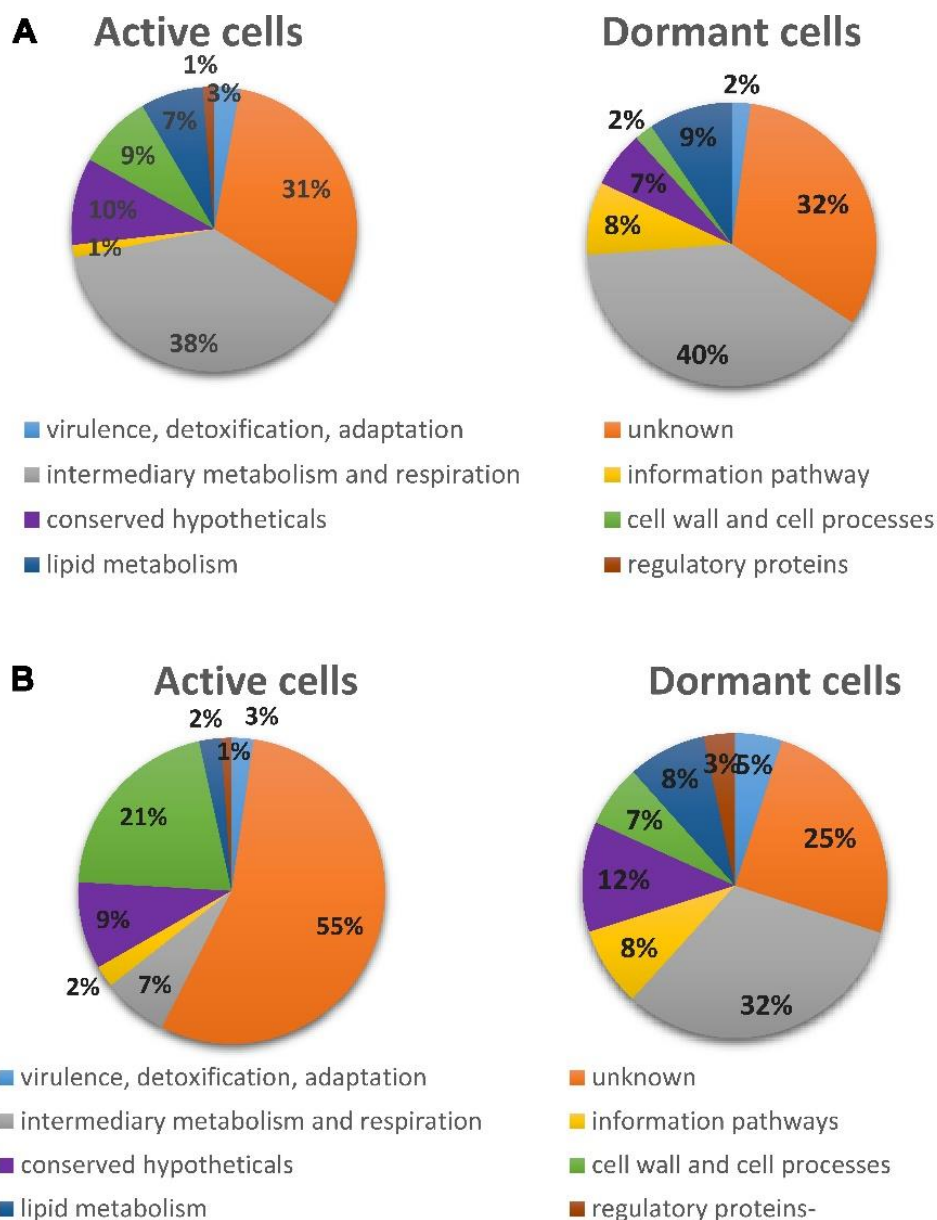


Рис. 56. Распределение белков по функциональным категориям в протеомном профиле активно растущих и покоящихся клетках *M. smegmatis*. А - белки цитозольной фракции. В - белки фракции мембран.

Не более 10 % выявленных белков имели схожий уровень представленности в двух типах микобактерий, что является отражением значительных изменений в структуре и метаболизме покоящихся клеток *Msm* (Рис. 55).

Приблизительно 50 % белков из протеома покоящихся ОК *Msm* отсутствовали в протеоме активно растущих микобактерий. Эту группа белков была определена как «уникальные белки» для покоящихся форм *Msm* (Приложение 1).

Анализ распределения белков по функциональным категориям выявил уменьшение белков в категории «cell wall processes» во фракции мембран и в цитозоле у покоящихся клеток по сравнению с активными. В тоже время, наблюдается увеличение белков в категории «information processes» в обеих фракциях у покоящихся клеток (Рис. 56). Это, очевидно, свидетельствует о супрессии метаболических процессов, связанных с модификацией клеточной стенки у покоящихся клеток и включения регуляторных механизмов при переходе в покой.

3.2.4.2. Характеристика представленности белков в активно растущих и покоящихся формах *M. tuberculosis*.

Был проведен анализ протеомных профилей активно растущих клеток *Mtb*, а также покоящихся форм, хранившихся 4.5 месяца (П1) и 13 месяцев (П2). Было проанализировано 629 белков в цитозольной фракции бактерий и 502 белка в мембранной.

Было выявлено, что разнообразие белков в протеомном профиле покоящихся микобактерий меньше выражено, чем в протеоме активно растущих клеток (Рис. 57), что, вероятно, отражает активность деградационных процессов в период длительного хранения ОК *Mtb*. Между двумя группами покоящихся микобактерий (П1 и П2) разница в белковом наборе оказалась небольшой. Больше 50 % белков выявляются как в П1, так и в П2 состоянии, что указывает на высокую стабильность этих белков при длительном хранении в условиях стресса (Приложение 2). В состоянии П1 имеется группа «уникальных» белков, которые отсутствуют в П2 состоянии и в протеоме активно растущих клеток *Mtb* (Приложение 2). Возможно, эти белки принимали участие в модификации метаболизма бактериальной клетки в процессе перехода в состояние покоя, а затем подверглись деградации.

В протеоме покоящихся форм состояния П2 обнаружена группа белков, являющаяся «уникальной» только для этого типа микобактериальных клеток.

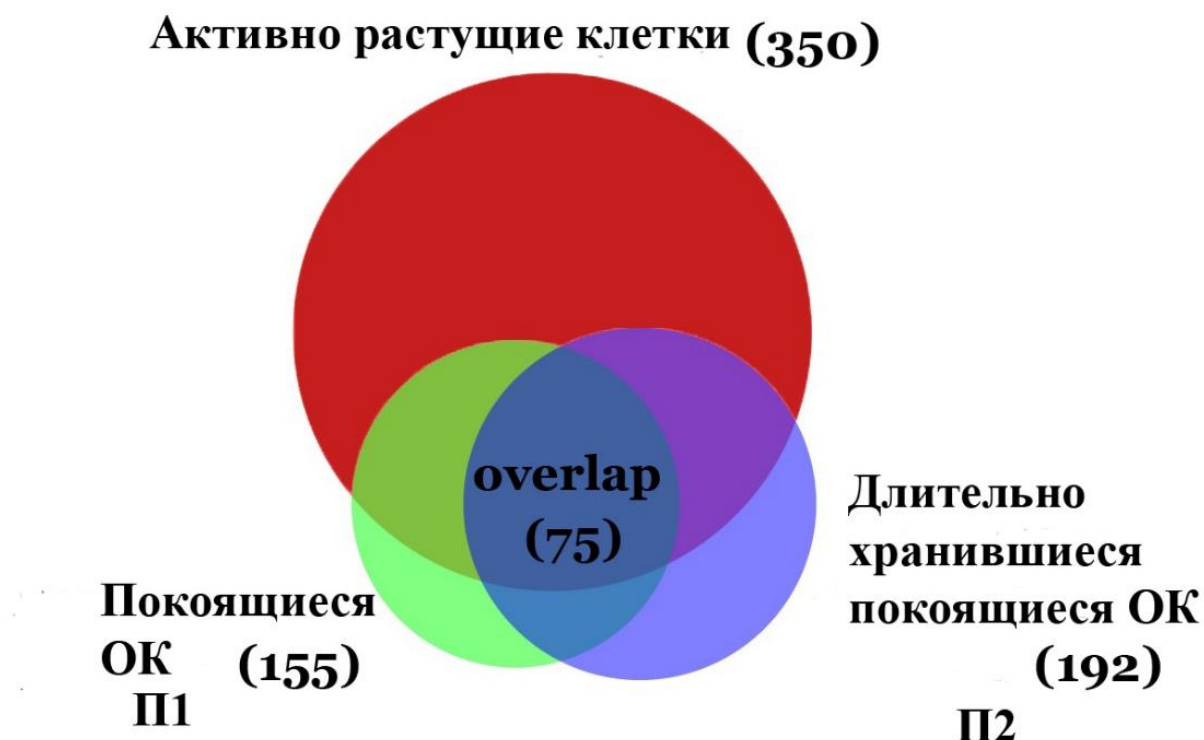


Рис. 57. Диаграмма Венна, отражающая перекрывание белков между протеомным профилем активно растущих и покоящихся ОК *M. tuberculosis*.

Таким образом, длительно хранившиеся (свыше года) покоящиеся формы *Mtb* характеризуются существенным разнообразием белков, несмотря на полное отсутствие процессов биосинтеза макромолекул.

3.2.4.3. Основные метаболические пути покоящихся форм микобактерий.

Сравнительный анализ протеомных профилей покоящихся клеток *Msm* и *Mtb* выявил большое сходство в представленности ферментов различных путей метаболизма, что указывает на общую стратегию ответа на стресс, ведущую к формированию морфологически измененных покоящихся клеток, как патогенных микобактерий, так и не патогенных. Рассмотрим основные черты, характерные для покоящихся ОК микобактерий.

Гликолиз.

Гликолитический путь является первостепенным для получения энергии для поддержания жизнеспособности длительно персистирующих *Mtb* в отсутствие аэробного дыхания микобактерий. Так, штамм *Mtb*, в клетках которого отсутствует ген фосфоглюкокиназы (контролирует 1-ю стадию гликолиза), способен вызывать острую форму туберкулезной инфекции при заражении мышей, но не способен участвовать в развитии хронической формы туберкулеза у животных (Marrero et al., 2013). При делеции гена фосфофруктокиназы в условиях гипоксии наблюдается накопление промежуточных продуктов метаболизма глюкозы, что оказалось токсичным для бактерий (Phong et al., 2013). Эти результаты не согласуются с мнением, что основной способ получения энергии у покоящихся микобактерий связан с липидным обменом.

Образование пирувата из глюкозы в гликолитическом пути происходит за счет активности девяти ферментов, семь из них были выявлены в протеомах покоящихся форм как *Mtb*, так и *Msm* (Рис. 58). Но два фермента - фосфофруктокиназа (MSMEG_2366/Rv2029) и фосфоглюкомутаза (MSMEG_2136/Rv3068c), не были обнаружены не только в протеомном профиле покоящихся микобактерий, но и в протеоме активно растущих клеток они также отсутствовали, что, вероятно связано с низкой концентрацией этих ферментов.

Кроме глюкозы, источником углерода для микобактерий может также выступать и глицерин, содержащийся в среде роста. Действительно, в протеоме ОК обнаружены все ферменты, участвующие в метаболизме глицерина до пирувата, кроме одного - глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (MSMEG_6761/MSMEG_4332/ Rv2249), контролирующего образование дигидроксиацетона из глицерол-3-фосфата, но его наличие подтверждено энзиматически (Таблица 11).

Активность глицерин-3-фосфатдегидрогеназы в экстракте белков покоящихся клеток *Msm* оказалась существенно ниже, чем в белковом экстракте активно растущих микобактерий (Таблица 11), что указывает на низкую вероятность

использования глицерина в период покоя и высокую вероятность получения пирувата из глюкозы.

Таблица 11. Активность ферментов и концентрация некоторых метаболитов в активно растущих и покоящихся формах *M. smegmatis*.

		Активно растущие микобактерии	Покоящиеся микобактерии
Активность ферментов		мкмоль/мин/мг белка	
1	Глицеролкиназа	665±49	78±49
2	Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	2550±190	93±4
3	3-фосфоглицераткиназа	618±46	241±17
4	Глицеральдегид-3-Р-дегидрогеназа	322±15	108±9
5	Пируваткиназа	655±23	395±32
6	Лактатдегидрогеназа (хинон-зависимая)	350±20	270±30
7	Лактатдегидрогеназа	0	0
8	Алкогольдегидрогеназа	200±130	80±40
9	Изоцитратлиаза	68±33	0
10	НАДН оксидаза (OD ₃₄₀)	221±40	8±3
Метаболиты			
12	Тиолы, мкмоль/мг биомассы	350±160	820±150
13	НАД, нмоль/мг биомассы	0.038±0.012	0.0037±0.001
14	НАДН, нмоль/мг биомассы	0.153±0.017	0.0137±0.002
15	Соотношение НАД/НАДН	4.03	3.7

Поскольку не все ферменты были обнаружены в протеомах исследуемых микобактерий, была экспериментально оценена активность этих ферментов в грубом экстракте белков микобактерий. Было продемонстрировано наличие активностей ферментов: глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, 3-фосфоглицераткиназы и пируваткиназы как в активно растущих, так и в покоящихся *Msm* (Таблица 11). Пируваткиназа, контролирующая образование пирувата из фосфоенолпирувата, является одним из наиболее представленных ферментов в протеоме покоящихся микобактерий, что указывает на возможность образования пирувата из глюкозы. В условиях отсутствия доступной глюкозы,

образование глюкозо-1-фосфата в покоящихся ОК *Msm* может осуществляться из глюкозы за счет активности α -глюканфосфорилазы (MSMEG_4915) или из гликогена с участием α -1,6-глюкангидролазы (MSMEG_3186). Еще одним источником глюкозы может быть обнаруженная в ОК *Msm* запасенная трегалоза (см. выше).

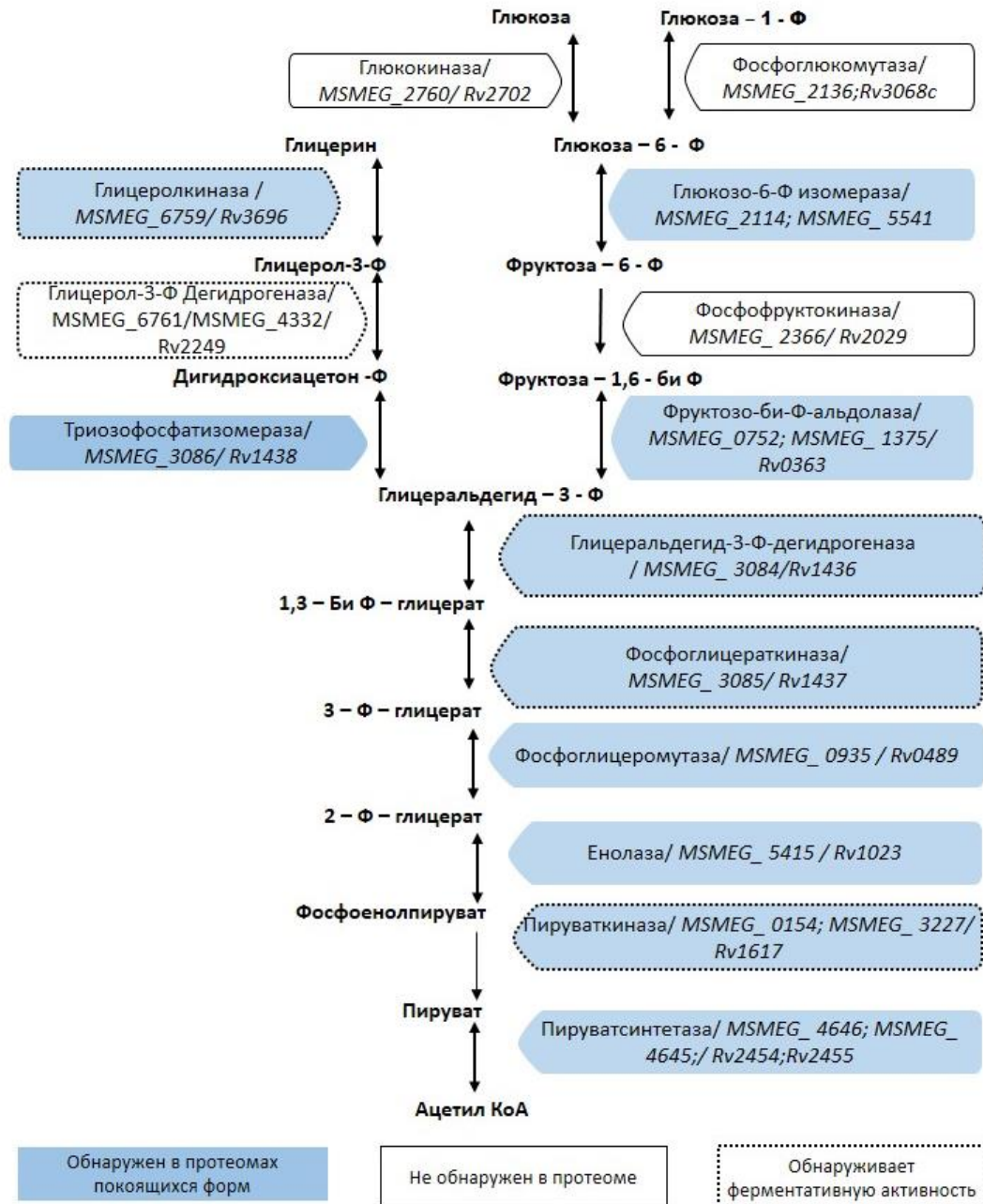


Рис. 58. Ферменты гликолиза, выявленные в протеомных профилях покоящихся клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*.

Образующийся в результате активности гликолиза пируват может использоваться для поддержания редокс-статуса бактериальной клетки путем превращения в ацетил-КоА с помощью пируватсинтазы. Также из пирувата может образовываться оксалоацетат за счет активности пируваткарбоксилазы. Остается под вопросом возможность превращения пирувата в конечные метаболиты гликолиза подобно процессу, происходящему в анаэробных бактериях. Для образования этанола необходимо наличие пируват-декарбоксилазы, осуществляющей трансформацию пирувата в ацетальдегид. Этот фермент не аннотирован в геноме исследуемых микобактерий, но в протеомном профиле покоящихся форм был обнаружен фермент индол-3-пируват-декарбоксилаза (MSMEG_5735/Rv0853), который наряду со своим обычным субстратом индол-3-пируватом может использовать и пируват (Schütz et al., 2003). Дальнейшая трансформация ацетальдегида в этанол может происходить за счет активности алкогольдегидрогеназ, хорошо представленных в протеомном профиле покоящихся микобактерий: Rv0761c, Rv1862, Rv3045, MSMEG_0127, MSMEG_6242, MSMEG_2079. Активность алкогольдегидрогеназ продемонстрирована экспериментально в разных типах клеток *Msm* (Таблица 10).

В микобактериях в состоянии покоя наблюдается накопление лактата (о чем будет сказано ниже, а также этот факт описан в работе Циммерманна с соавторами (Zimmermann et al., 2015)), который может образовываться из пирувата. При этом лактатдегидрогеназа не аннотирована в геноме микобактерий и энзиматическая активность этого фермента экспериментально не детектируется (Таблица 10), что вызывает вопросы относительно пути образования значительных количеств лактата в покоящихся микобактериях. Обнаружена хинон-зависимая лактатдегидрогеназа MSMEG_2492/Rv1872, но этот фермент участвует в обратной реакции.

Таким образом, ферменты гликолиза хорошо представлены в протеоме покоящихся ОК *Msm* и *Mtb*, и, возможно, могут проявлять активность во время длительного хранения таких микобактерий в условиях стресса, что дает возможность поддержания минимального уровня АТФ, необходимого для

поддержания жизнеспособности бактерий, при отсутствии функционирования аэробного дыхания (Таблицы 9, 10, 11).

Цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный шунт.

В протеомном профиле покоящихся ОК *Msm* выявлены все основные восемь ферментов, участвующих в цикле лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот или цикл Кребса), однако, среди белков покоящихся ОК *Mtb* обнаружено всего шесть ферментов этого цикла. При этом среди белков активно растущих микобактерий (*Msm* и *Mtb*) выявлены все ферменты цикла Кребса. Поскольку в покоящихся микобактериях практически отсутствует детектируемое дыхание вследствие значительного снижения активности электрон-транспортной цепи (Таблицы 9, 10), то функционирование цикла Кребса в микобактериях в состоянии покоя вызывает сомнения.

Ранее было продемонстрировано, что в условиях гипоксии в модели Вейна в нерепликативных микобактериях происходит активация глиоксилатного шунта (Wayne and Lin, 1982), а также в микобактериях, находящихся в макрофагах и организме мыши (McKinney et al., 2000; Muñoz-Elías and McKinney, 2005). Мы также проверили наличие ферментов глиоксилатного пути в протеоме покоящихся микобактерий, полученных в условиях закисления внешней среды в стационарной фазе роста. Малатсинтетаза (MSMEG_3640/Rv1837) была выявлена в протеомных профилях активно растущих и покоящихся микобактерий двух видов. Однако изоцитратлиаза (Icl; MSMEG_0911; MSMEG_3706/ Rv1915, Rv1916) не проявилась в протеомах покоящихся микобактерий, но была обнаружена в активно растущих клетках. Кроме этого, активность изоцитратлиазы не детектировалась в экстракте покоящихся ОК *Msm*, в отличие от экстракта белков активно растущих бактерий (Таблица 11). Полученные результаты вызывают сомнение относительно важности глиоксилатного шунта в состоянии покоя микобактерий, а также демонстрируют очередное несовпадение качеств покоящихся микобактерий с измененной морфологией и нерепликативными в условиях гипоксии бактериями в модели Вейна.

В работе Циммерманна с соавторами высказано предположение о использовании микобактериями при анаэробнозе восстановительной цепи цикла трикарбоновых кислот от пирувата до сукцината в обратном направлении через малат и фумарат, в результате этого ожидается внеклеточное накопление сукцината. Подобный механизм позволит окислить восстановительные эквиваленты, образованные в гликолизе, и за счет электрогенного выброса сукцината будет создаваться мембранный потенциал (Zimmermann et al., 2015). Последнее может быть важным для поддержания уровня АТФ и жизнеспособности покоящихся микобактерий в период длительного хранения. Поскольку в протеоме покоящихся ОК *Mtb* ферменты прямого направления цикла Кребса изоцитратдегидрогеназа (Rv0066) и цитратсинтаза (Rv0889) отсутствуют, то можно предположить, что несмотря на отсутствие анаэробных условий в процессе образования покоящихся форм в модели закисления внешней среды, возможно цикл трикарбоновых кислот функционирует подобным образом.

В протеомном профиле покоящихся микобактерий выявлены ферменты, участвующие в синтезе и метаболизме аминокислот: глутамата (сукцинатсемиальдегид дегидрогеназа/Rv0234) и аспарагина (аспарагиназа/MSMEG_3173/Rv1538), аспартата (аргининосукцинат синтетаза/Rv1658/MSMEG_3770, аспартаттрансаминаза/MSMEG_6286). В результате анаэробных реакций эти аминокислоты могут служить добавочным источником фумарата и кетоглутарата в цикле Кребса.

Несмотря на не детектируемую активность дыхательной цепи в период покоя микобактерий, в протеоме покоящихся ОК *Mtb* обнаружены все субъединицы АТФазы (альфа субъединица/Rv1308, гамма субъединица /Rv1309, бета субъединица Rv1310), которые оказались стабильны и могут активироваться на ранних этапах реактивации.

Регуляторы транскрипции мРНК и трансляции белков.

В протеомном профиле покоящихся микобактерий были обнаружены некоторые регуляторы транскрипции и трансляции, несмотря на отсутствие активности этих процессов в период покоя. Было выявлено увеличение

представленности транскрипционного фактора MprA (Mycobacterial persistence regulator/Rv0981/ MSMEG_5488) как в протеоме покоящихся *Msm*, так и *Mtb*. MprA является регуляторным компонентом гистидинкиназной сигнальной системы **MprAB**. Было продемонстрировано, что цепь реакций «строгого ответа» в клетках *Msm*, находящихся в условиях стресса, запускается с полифосфата, а синтез (p)ppGpp контролируется системой mprAB-sigE-relA (Sureka et al., 2008). Запуск реакций «строгого ответа» с полифосфата является уникальным явлением для микобактерий (Magnusson et al., 2005). MprA является регулятором сигма-фактора sigB (He et al., 2006), который важен для внутриклеточной персистенции патогена (Tuchscher et al., 2015). SigB/MSMEG_2752 выявлен в протеоме покоящихся ОК *Msm* и не обнаружен среди белков активно растущих микобактерий. Как было продемонстрировано ранее, sigB участвует в развитии устойчивости к окислительному стрессу и условиям недостатка углерода в *L. monocytogenes* (Ferreira et al., 2001) и является одним из основных регуляторов общего ответа на действие стрессовых факторов (Van Schaik and Abee, 2005).

Вторым важным регулятором, представленность которого увеличивается в протеомном профиле покоящихся *Mtb* по сравнению с активно растущими микобактериями, является phoP/Rv0757, входящий в состав **PhoPR** двухкомпонентной системы. Эта система контролирует экспрессию *espA*, необходимого для вирулентности (Pang et al., 2013; Zhang et al., 2018). Было продемонстрировано, что активация этой системы происходит в условиях низких значений pH и окислительного стресса (García et al., 2018). Кроме этого, недавно было обнаружено, что система PhoPR негативно регулирует систему DosRS (Vashist et al., 2018), в связи с этим, возможно, мы не смогли детектировать DosR в протеоме покоящихся микобактерий.

В протеомном профиле покоящихся ОК *Mtb* выявлен еще один регулятор транскрипции **Wag31**/Rv2145, участвующий в регуляции синтеза пептидогликана клеточной стенки бактерий. Однако поскольку его активность зависит от степени фосфолирования протеинкиназами PknA и PknB (Kang et al., 2008),

участвующими в делении бактерий, Wag31 является запасенным белком и будет важен на ранних этапах реактивации.

В протеомном профиле покоящихся ОК *Msm* выявленные немногочисленные факторы транскрипции в основном оказались негативными регуляторами, что неудивительно, поскольку в процессе перехода микобактерий в покоящееся состояние наблюдается выраженное снижение активности многих метаболических процессов. Так в протеоме ОК *Msm* был выявлен **NusA**, являющийся транскрипционным фактором элонгации, и не детектируется в активно растущих клетках. NusA контролирует остановку и прекращение считывания ДНК ферментом ДНК-зависимой-РНК-полимеразой в клетках *E. coli* (Yakhnin et al., 2008), а также предотвращает агрегацию белков при тепловом шоке (Li et al., 2013).

Еще один уникальный для покоящихся ОК *Msm* фактор транскрипции **MSMEG_3335** является репрессором генов глиоксилатного шунта - IclR (isocitrate lyase regulator)- в клетках *E. coli* (Sunnarborg et al., 1990), что совпадает с нашими результатами по отсутствию активности изоцитратлиазы в экстракте покоящихся микобактерий (Таблица 11). При сравнении аминокислотных последовательностей белка MSMEG_3335 и белка IclR из *E. coli* выявляется всего 29 % гомологии, что, возможно, указывает и на наличие других функций для этого белка. Транскрипционные факторы семейства IclR могут иметь довольно разнообразные функции: участвуют в контроле споруляции в *Streptomyces griseus* и *Streptomyces coelicolor* (Van Wezel et al., 2000); участвуют в регуляции разрушения полисахаридов клеточной стенки растений патогеном *Erwinia sp* (Thomson et al., 1999); участвуют в регуляции деградации и катаболизма ароматических соединений (Molina-Henares et al., 2006).

Наиболее представленным белком в протеомном профиле покоящихся ОК *Msm* являлся MSMEG_6227 (Приложение 1), который, согласно биоинформатическому анализу принадлежит семейству транскрипционных регуляторов PadR. Обнаруженный белок имеет большое сходство с транскрипционным регулятором PadR, который негативно регулирует padA

(декарбоксилазу феноловых кислот) в *Pediococcus pentosaceus* в ответ на воздействие токсичных феноловых кислот (Barthelmebs et al., 2000). Было показано, что PadR-подобные регуляторы также принимают участие в координировании различных физиологических процессов в клетках некоторых бактерий, таких как множественная лекарственная устойчивость, устойчивость к нагреванию и вирулентность (Madoori et al., 2009; Tran et al., 2008). Однако, ничего не известно о роли и функциях этих белков в клетках *Mycobacterium*.

При анализе литературных данных было установлено, что PadR-подобные белки, прежде всего, могут быть регуляторами двух очень важных для поддержания состояния покоя процессов. Во-первых, они являются транскрипционными регуляторами Usp (universal stress protein) белков (Gury et al., 2009), которые в свою очередь могут связываться с АТФ или кислородом внутри клеток, что приводит к торможению метаболизма в целом. Во-вторых, неоднократно встречаются работы, в которых установлена роль PadR-подобных белков в развитии устойчивости бактерий к широкому ряду лекарственных препаратов посредством регулирования транскрипции генов, кодирующих ABC транспортеры, которые отвечают за экспорт антибиотиков из цитоплазмы бактерий (Lubelski et al., 2006).

В протеомах покоящихся микобактерий (*Msm* и *Mtb*) выявлены положительные регуляторы трансляции белка. Поскольку синтез белка в этом состоянии микобактерий не детектируется, то можно предположить, что эти регуляторы запасены и их активация происходит на ранних стадиях реактивации ОК микобактерий. К таким регуляторам трансляции относится фактор элонгации Tu/ Rv0685, который в активно растущих бактериях доставляет аминоксил-тРНК к рибосоме, однако в условиях стресса наблюдается его фосфорилирование протеинкиназой PknB, что приводит к дезактивации фактора элонгации Tu и остановке синтеза белка (Sajid et al., 2011).

Белки защиты от повреждающих факторов.

В микобактериях имеется несколько стратегий сохранения жизнеспособности в условиях воздействия окислительного стресса. Они способны инактивировать

активные формы кислорода (АФК), репарировать окисленные биомолекулы, а также избавляться от АФК (Ткаченко, 2012).

В протеоме покоящихся микобактерий найдено выраженное разнообразие энзимов, участвующих в инактивации АФК: тиолпероксидаза/MSMEG_3479, каталаза/пероксидаза (katG Rv1908/MSMEG_3461 bpoC/Rv0554), супероксиддисмутазы (sodA Rv3846/MSMEG_6427; sodC Rv0432/MSMEG_0835), альдо/кеторедуктаза (MSMEG_6746), алкилгидропероксидаза (MSMEG_4890), алкилгидропероксидредуктазы (MSMEG_4891; MSMEG_4753).

Известно, что для защиты от окислительного стресса многие бактерии применяют глутатион, который является токсичным для микобактерий (Dayagam et al., 2006). Кроме этого, в микобактериях имеются пути синтеза веществ, способных, как и глутатион восстанавливать окисленные биомолекулы. К таким веществам принадлежат тиоредоксин и микотиол.

Среди белков протеома покоящихся ОК *Msm* найдены ферменты MSMEG_5129, MSMEG_5261, участвующие в синтезе микотиола, в протеоме активно растущих микобактерий они не обнаружены. Функционально микотиол соответствует защитному действию глутатиона (Newton and Fahey, 2002) и участвует в защите клеток *Mtb* от окислителей, токсинов и антибиотиков (Buchmeier et al., 2003). Существует целая группа микотиол-зависимых белков, принимающих участие в детоксификации электрофильных компонентов и инактивации активных форм азота и кислорода (Newton et al., 2008). Например, микотиол участвует в дезактивации формальдегида путем его окисления микотиол-зависимой формальдегид-дегидрогеназой/MSMEG_4340, являющейся «уникальным» белком для покоящихся ОК *Msm*. В связи с этим, был измерен уровень тиолов в активно растущих и покоящихся клетках *Msm*. Действительно, количество тиолов в покоящихся микобактериях оказалось в 2.5 раза выше, чем в активно растущих (Таблица 11).

В протеоме покоящихся ОК *Mtb* был обнаружен другой функциональный аналог глутатиона – тиоредоксин (тиоредоксин C/Rv3914), который принимает участие в инактивации АФК, восстановлении дисульфидных связей в белках и

поддержании окислительно-восстановительного баланса внутри бактериальной клетки (Akif et al., 2008).

В протеомном профиле покоящихся микобактерий обнаружена группа ферментов, принимающих участие в детоксификации альдегидов, в частности метилглиоксаля. Среди них глиоксалаза/ MSMEG_5680 и альдегид-дегидрогеназа/MSMEG_2597. Среди ферментов, ответственных за защиту от активных форм азота в ОК микобактерий найдены: дигидролипамидадегидрогеназа MSMEG_0903/Rv0462, дигидролипамида-сукцинилтрансфераза MSMEG_4283/Rv2215, алкилгидропероксидредуктаза MSMEG_4891, алкилгидропероксидаза MSMEG_4890, S-нитрозомикотиол редуктаза Rv2259. В протеоме ОК *Msm* выявлен фермент глутатион S-трансфераза/MSMEG_5695, участвующий в детоксификации окисленных липидов.

Среди белков протеома покоящихся *Msm* увеличивается представленность ферментов синтеза порфиринов (Приложение 1), этот факт был подтвержден установленным нами накоплением порфиринов в период перехода клеток в покоящееся состояние (см. выше).

В протеомах микобактерий присутствует 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.

Несмотря на то, что в исследуемых покоящихся микобактериях не наблюдается активации Dos регулона, в протеоме было обнаружено несколько белков из 48, входящих в состав этого регулона. Был обнаружен альфа кристаллин (hspX/Rv2031/MSMEG_3932), постоянно выявляемый в микобактериях при действии всех видов стресса (Mishra and Sarkar, 2015; Rosenkrands et al., 2002; Starck et al., 2004), а также универсальные белки стресса Rv1996, Rv2623, Rv2624 и белки с неизвестной функцией MSMEG_0082, MSMEG_3131, Rv2004, Rv2629.

В протеомном профиле покоящихся ОК *Mtb* выявлен ДНК-связывающий гистонотипный белок hupB/Rv2986, участвующий в стабилизации ДНК в условиях стресса, как было показано ранее (Anuchin et al., 2010; Colangeli et al., 2009; Gupta et al., 2014).

Наиболее представленным белком в экстракте фракции мембран покоящихся форм *Mtb* является iniB/Rv0341 с неизвестной функцией, имеющий ДНК-связывающий домен согласно предварительной аннотации Pubmed database, и, возможно, также принимающий участие в стабилизации нуклеиновых кислот клетки.

Процессы биосинтеза.

В протеомном профиле покоящихся микобактерий резко снижается количество белков, участвующих в различных биосинтетических процессах по сравнению с протеомом активно растущих бактериальных клеток. В состоянии покоя в микобактериях не обнаруживаются ферменты синтеза многих аминокислот: валина и изолейцина (ilvB1/Rv3003c; ilvG/Rv1820), лейцина (leuA/Rv3710), лизина и диаминопимелата (dapA /Rv2753c, dapD/ Rv1201c, dapF/Rv2726c, dapB/Rv2773c, asd/Rv3708c), гистидина (hisA/MSMEG_3209), триптофана (trpC/Rv1611, trpA/ Rv1613), треонина (thrC/ Rv1295), серина и глицина (glyA1/Rv1093). В ОК микобактерий отсутствуют ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот: тимидилата (dut/MSMEG_2765), пуринов (MSMEG_3785, folD/MSMEG_1647/Rv3356; PurN/Rv0956) и пиримидинов (carA/MSMEG_3046). Также в состоянии покоя в клетках не обнаружены ферменты синтеза пантотаната (panC/MSMEG_6097), менахинона (menD/Rv0555), пиридоксина (pdxH/MSMEG_2937/Rv2607), кофактора дегидрогеназ и оксидоредуктаз молибдоптерина (moeB1/Rv3206c) и кобаламина (cobQ2/MSMEG_6277, cobT/Rv2207) moeA1/Rv0994).

Однако в покоящихся микобактериях (*Mtb* и *Msm*) были выявлены ферменты, принимающие участие в **синтезе клеточной стенки и пептидогликана**: аланиндегидрогеназа (MSMEG_2659/Rv2780), ddlA/Rv2981, murD/MSMEG_4229, murE/Rv2158 и murF/MSMEG_4231/Rv2157c.

В покоящихся ОК *Msm* обнаружены «уникальные» для этих форм ферменты, принимающие участие в **синтезе порфиринов** (MSMEG_0953, MSMEG_0956, MSMEG_2780) и **лейцина** (MSMEG_6271 и MSMEG_2379). Также в этом типе бактерий были выявлены ферменты **синтеза трегалозы** (MSMEG_6514 и MSMEG_6515), **гликогена** (MSMEG_4918) и **полифосфатов** (MSMEG_2391). Вероятно, при подготовке бактерий к состоянию покоя происходит накопление этих веществ, что и было продемонстрировано выше для порфиринов и трегалозы. Среди «уникальных» белков покоящихся микобактерий была выявлена секретируемая миколитрансфераза (FbpB /Rv1886c), которая участвует в **синтезе димикольта трегалозы** (корд-фактора), необходимого для вирулентности и сохранения целостности клеточной стенки бактерий в условиях макрофага (Nguyen et al., 2005).

Дегградация биомолекул.

Протеомный профиль покоящихся микобактерий обогащен ферментами, принимающими участие в гидролизе основных компонентов клетки (белков, пептидов, аминокислот, липидов и жирных кислот). Хорошо представлены гидролазы липидов, в том числе пропионил-соА-карбоксилаза MSMEG_1813/Rv3280, ацетил-соА-дегидрогеназа MSMEG_1821/Rv3272, ацетил-соА-эстераза MSMEG_2938/Rv2605, ацетил-соА-ацетилтрансфераза MSMEG_6008/Rv3556c.

В протеоме «покоя» выявлено большое разнообразие протеаз и пептидаз: Rv0291, Rv3596c, Rv2535c, MSMEG_0732/Rv0732, clp MSMEG_4672/Rv2460, Rv2110c, Rv2109c, MSMEG_3895, MSMEG_4690, MSMEG_4673, MSMEG_4200, MSMEG_2092, MSMEG_0234.

В покоящихся микобактериях обнаружен фермент полинуклеотидфосфорилаза (MSMEG_2656), который входит в состав РНК деградосом и участвует в дегградации мРНК (Py et al., 1996).

Таким образом, в состоянии покоя в микобактериях обнаружено значительное количество гидролизующих ферментов, что, с одной стороны обеспечивает уничтожение 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 длительном переживании в состоянии покоя, то есть таким образом может обеспечиваться «катаболическое выживание».

Транспорт веществ через мембрану.

Протеомный профиль активно растущих микобактерий отличается от протеома покоящихся форм по количеству белков, участвующих в активном транспорте веществ через мембрану. В состоянии покоя исчезают многие транспортеры (порины, ABC транспортеры и др.), осуществляющие перенос белков, аминокислот, олигопептидов, ионов калия, железа, и т.д. через мембрану клетки. В ОК *Mtb* выявлен экспортер макролидов, участвующий в транспорте антибиотиков из клетки (Rv2477c).

Пул стабильных белков Mtb.

В протеоме длительно хранившихся покоящихся ОК *Mtb* (П2, 13 месяцев) значительно снижается разнообразие белков, но оставшиеся белки сохраняют свою целостность (что было очевидно на 2Д-электрофореграммах) (Рис. 53 С, F). Эти белки (Приложение 2) были разделены на группы согласно их функциональным категориям. Часть белков обладала большей представленностью в протеоме покоящихся форм по сравнению с их представленностью в протеоме активно растущих микобактерий, что может быть полезно в разработке новых диагностических систем, направленных на выявление латентного ТБ.

К первой группе стабильных белков в состоянии П2 относятся ферменты центральных метаболических путей (гликолиз, цикл Кребса, синтез аминокислот, дыхательная цепь) и некоторые регуляторы транскрипции и трансляции, которые практически не активны в этот период, но необходимы на ранней стадии реактивации. Вторая группа стабильных белков обеспечивает защиту от окислительного стресса (энзимы, дезактивирующие АФК; шапероны) и

способствует поддержанию метаболизма на минимальном уровне (ферменты деградации биомолекул).

3.2.4.4. Сравнение протеома покоящихся ОК микобактерий, полученных при постепенном закислении внешней среды с протеомами, полученными с применением других моделей покоя микобактерий.

Для сравнительного анализа протеомных профилей, полученных на разных моделях микобактериального покоя, были выбраны первые 200 наиболее представленных белков. В нашей модели закисления перекрывание протеомов между активно растущими и покоящимися клетками составляет меньше 50 % (47% для *Mtb* и 46% для *Msm*) (Рис. 54, 59). В случае модели гипоксии Вейна перекрывание между активными и покоящимися бактериями составляет 69 % (Schubert et al., 2015), а в модели недостатка питательных веществ Лебеля такое перекрывание соответствует 66 % (Рис. 56). Скорее всего такое выраженное различие в белках между активно растущими и покоящимися микобактериями в модели закисления связано с длительным хранением покоящихся форм в условиях стресса (13 месяцев для *Mtb* и 1 месяц для *Msm*). В случае других моделей микобактерии находились в состоянии покоя гораздо меньше времени (20 суток для модели Вейна и 6 недель для модели Лебеля).

Число дифференциально экспрессируемых белков между активно растущими и покоящимися микобактериями в разработанной нами модели закисления гораздо выше, чем в широко используемой модели гипоксии Вейна. Методом двумерного электрофореза в модели Вейна было выявлено 16-21 белок, экспрессия которых различалась в активных и покоящихся клетках *Mtb* (Rosenkrands et al., 2002; Starck et al., 2004).

В модели Лебеля таких белков было 7 (Betts et al., 2002), а в поздней стационарной фазе 10 (Ang et al., 2014).

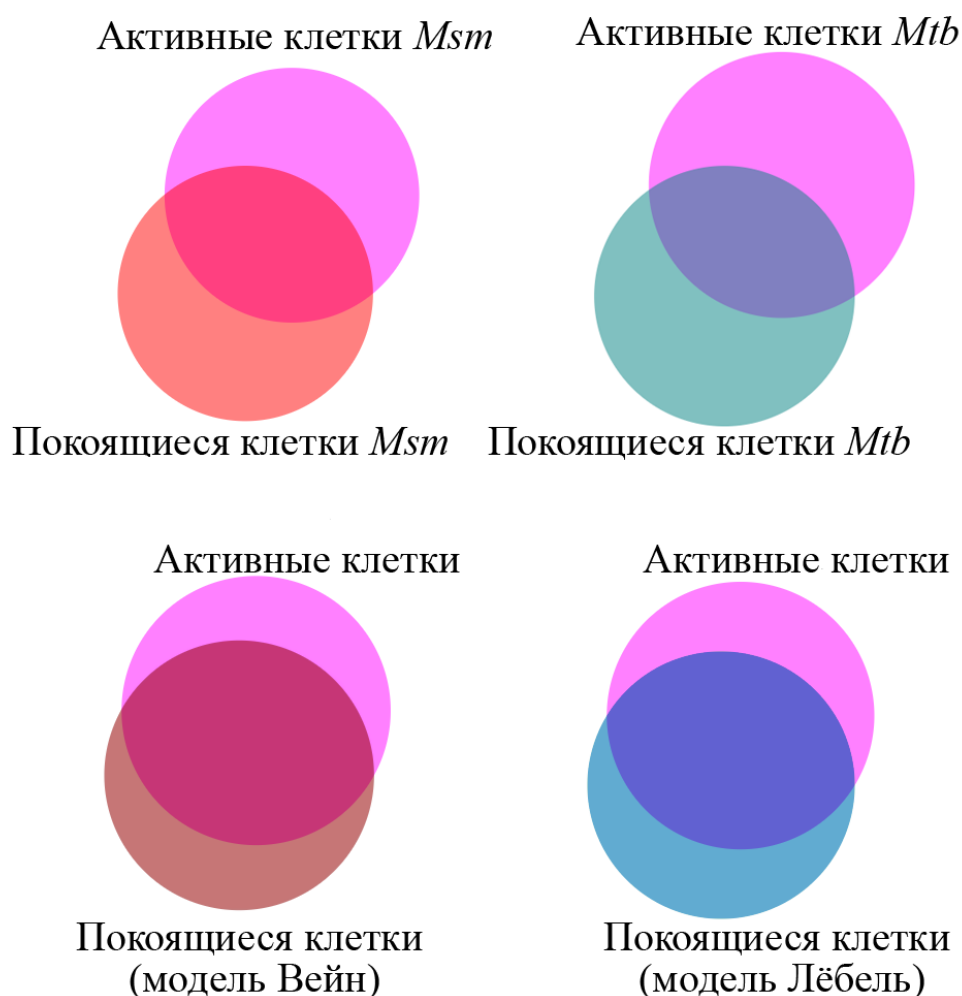


Рис. 59. Диаграммы Венна, отражающие перекрывание белков между активно растущими и покоящимися клетками в разных моделях покоя микобактерий. Анализ проводили относительно первых 200 самых представленных в каждой модели белков.

Возможно, такую разницу между моделью закисления в стационарной фазе с последующим длительным хранением полученных форм, характеризующихся низкой метаболической активностью и измененной морфологией, и ранее разработанными моделями можно объяснить более глубоким состоянием покоя бактерий в период «некультивируемости».

Было выявлено всего несколько белков в покоящихся микобактериях, которые совпадали с найденными белками на других моделях. К ним относится белок теплового шока гомолог α -кристаллина HspX (Rv2031 /MSMEG_3932), который был существенно представлен в модели закисления в ОК *Mtb* и *Msm*, а также в

модели гипоксии Вейна в нерепликативных формах *Mtb* (Rosenkrands et al., 2002; Starck et al., 2004), *Msm* (Mishra and Sarkar, 2015) и *M. bovis* (Boon et al., 2001). Увеличение количества аланиндегидрогеназы (MSMEG_2659) наблюдается как в нашей модели, так и во всех остальных опубликованных моделях нерепликативного состояния микобактерий (Jungblut et al., 1999; Rosenkrands et al., 2002). Одна из функций этого белка связана с поддержанием уровня NAD в бактериальной клетке при ограниченном доступе к конечному акцептору электронов (Hutter and Dick, 1998). Еще одним общим для всех моделей покоя микобактерий белком является гепарин-связывающий гемагглютинин (MSMEG_0919). В нашей модели он обнаружен как «уникальный» для покоя, а в модели Лебея продемонстрировано значительное увеличение количества этого белка (Albrethsen et al., 2013). Гепарин-связывающий гемагглютинин предлагается применять в качестве маркера для диагностики латентного ТБ (Hougardy et al., 2007).

В модели гипоксии Вейна наиболее существенным отличием протеома покоящихся нерепликативных микобактерий от протеома активно размножающихся бактерий являются белки покоящихся форм, входящие в Dos регулон (Park et al., 2003; Schubert et al., 2015). В модели получения покоящихся микобактерий в условиях постепенного закисления внешней среды в стационарной фазе роста, разработанной в данной работе, регулятор Dos регулона (MSMEG_3944/MSMEG_5244) не был обнаружен. Было выявлено всего несколько белков, относящихся к этому регулону. Ранее было продемонстрировано, что в более поздних фазах в модели гипоксии прекращается экспрессия белков Dos регулона, в отличие от ранних стадий перехода микобактерий в нерепликативное состояние (Rustad et al., 2008). В модели недостатка питательных веществ Лебея белки Dos регулона также были слабо выражены в протеомном профиле нерепликативных микобактерий (Albrethsen et al., 2013).

Для оценки числа общих белков в нашей модели, модели Вейна и модели Лебея были проанализированы 200 наиболее представленных белков из каждой

модели. В процессе сравнения белков длительно хранившихся ОК *Mtb* (П2) с моделями Вейна (Schubert et al., 2015) и Лебеля (Albrethsen et al., 2013) было выявлено 58 общих белков (Рис. 60). Из них 14 белков относятся к центральным метаболическим путям, а 11 белков участвуют в защите от стрессовых факторов. К общим белкам относятся протеины, принимающие участие в транскрипции и трансляции: ДНК-зависимая-РНК-полимераза (альфа и бета субъединицы) и факторы элонгации (Tu/Rv0685, Ts/Rv2889c). Вероятно, эти белки являются стабильными и необходимы покоей клетке либо для поддержания жизнеспособности в период стресса, либо для быстрого запуска процесса реактивации.

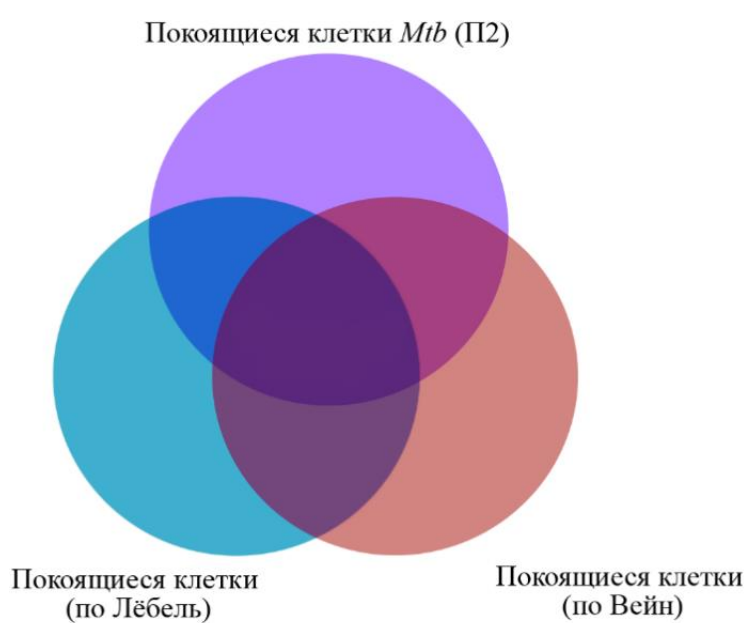


Рис. 60. Диаграмма Венна, отражающая общие белки в трех моделях покоя микобактерий.

Было обнаружено, что соотношение НАД/НАДН практически одинаково в активно растущих и покоящихся клетках *Msm*, несмотря на то, что концентрация этих нуклеотидов в покоящихся формах была снижена в 10 раз. Этот факт указывает на наличие в покоящихся клетках активных реакций, в результате которых происходит генерация НАД, иначе концентрация этого метаболита резко бы упала вследствие действия НАДН – зависимых ферментов, например, НАДН-оксидазы.

В покоящихся микобактериях обнаружено довольно большое разнообразие белков несмотря на отсутствие биосинтетических процессов (в том числе синтеза РНК и белков) в таких клетках. Мы впервые демонстрируем факт стабильности белков в покоящихся овоидных микобактериях при длительном хранении в условиях стресса, а также демонстрируем сохранение активности некоторых ферментов в этом состоянии клеток. Вероятно, такая стабильность белков обусловлена действием защитных систем, обнаруженных в протеомном профиле покоящихся клеток.

Все белки, составляющие протеом покоящихся микобактерий можно выделить в три группы: 1) экспрессируемые во время перехода бактерий из активного состояния в покоящееся, в том числе входящие в разнообразные защитные системы; 2) «запасенные» белки, необходимые для быстрого начала процесса реактивации при наступлении благоприятных условий; 3) белки, участвующие в поддержании минимального метаболизма покоящихся микобактерий для сохранения жизнеспособности клеток.

3.2.5. Микобактериальная клетка в состоянии покоя.

Обобщая вышеприведенные результаты, можно сделать вывод, что как патогенные, так и непатогенные неспорообразующие микобактерии способны под воздействием стрессовых факторов, в частности при адаптации к постепенному закислению внешней среды, переходить в состояние длительного покоя, характерными признаками которого является низкая активность метаболизма клетки, отсутствие деления, устойчивость к ряду антибиотиков (в частности, к рифампицину), 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 транскрипции и трансляции.

Мембрана такой клетки 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, о чем свидетельствует остаточный уровень АТФ, цАМФ и соотношения НАД/НАДН.

Более того, 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 восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот, превращающих пируват до сукцината, можно предположить превращение веществ в гликолитическом пути и далее в обратном направлении цикла Кребса через малат и фумарат. В результате может происходить накопление органических кислот, которые могут быть экскретированы из клетки. Такое накопление было подтверждено экспериментально (Nikitushkin, 2020). Подобный механизм позволит окислить восстановительные эквиваленты, образованные в гликолизе, синтезировать АТФ и за счет электрогенного выброса сукцината генерировать диффузионный мембранный потенциал.

Имеется значительное количество ферментов, участвующих в защите от окислительного стресса, детоксификации (супероксиддисмутаза, пероксидаза), а также шапероны, способные защищать белки от действия АФК, а также участвующие в процессах их репарации.

В микобактериях 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, протеаз и пептидаз, полинуклеотидфосфорилаза (MSMEG_2656), которая входит в состав РНК деградосом и участвует в деградации мРНК. Таким образом, в состоянии покоя в микобактериях обнаружено значительное количество гидролизующих ферментов, что, с одной стороны обеспечивает уничтожение 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 длительном переживании в состоянии покоя, обеспечивая состояние, которое мы предлагаем называть «катаболическое выживание».

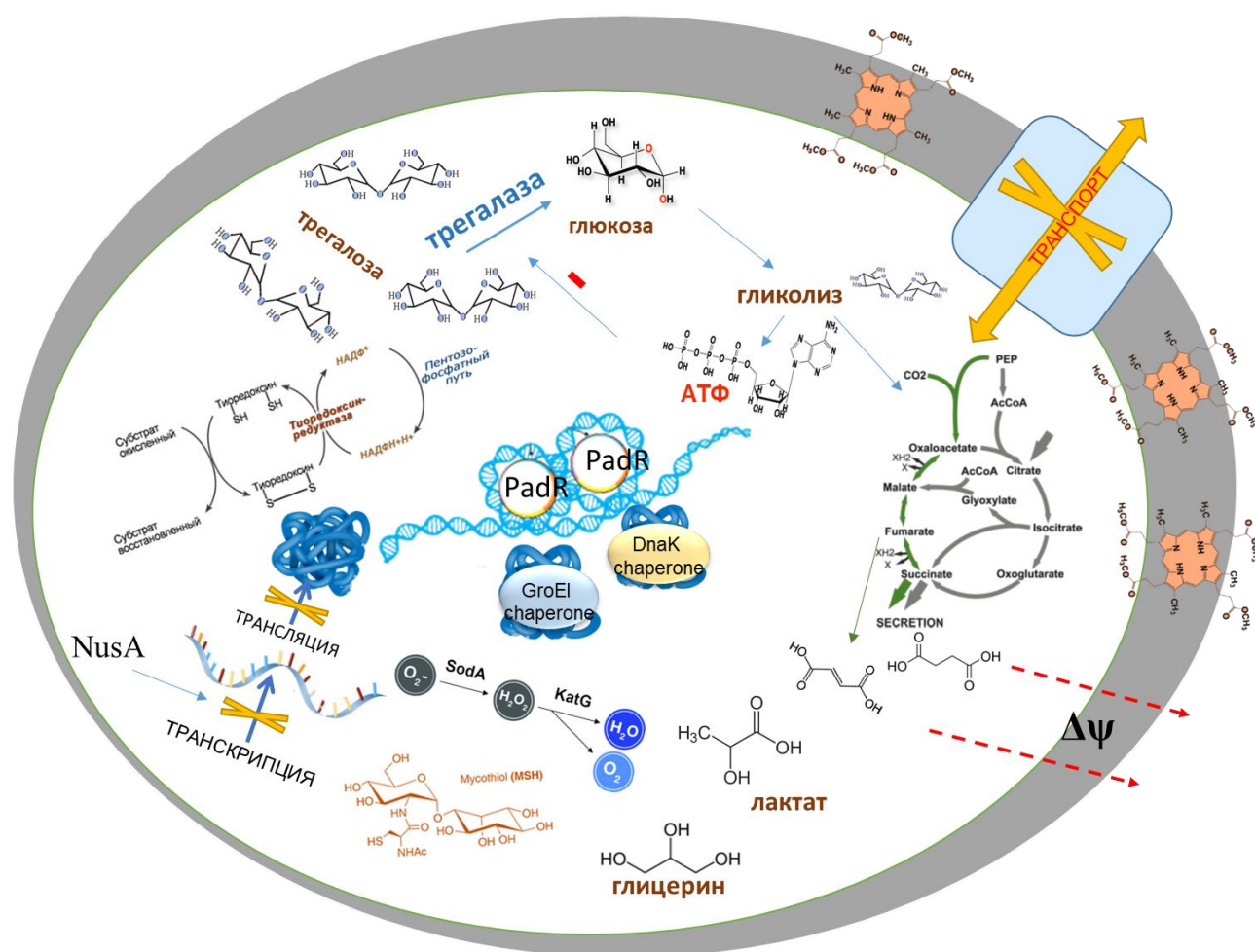


Рис. 61. Схема микобактерии в состоянии покоя.

При детальном анализе свойств полученных в данной работе покоящихся микобактерий было выявлено три стадии метаболического покоя этих микроорганизмов: 1) бактериальные клетки перестают размножаться, в них сильно снижается активность метаболических процессов, сохраняется способность к реактивации на плотных и жидких средах; 2) при длительном хранении покоящиеся микобактерии теряют способность расти на плотных средах, но способны к росту в свежих жидких средах; 3) стадия глубокого покоя, при которой ПМ утрачивают способность к спонтанной реактивации на стандартных плотных и жидких средах, реактивация таких форм осуществляется при наличии в среде специфических индукторов (белков семейства Rpf, супернатантов из активно растущих культур). Очевидно, что вторая и третья стадии покоя являются характерными для возбудителя латентного ТБ.

Разработанная модель образования покоящихся микобактерий в условиях постепенного закисления среды в стационарной фазе, в том числе для возбудителя ТБ, является хорошо воспроизводимой и удобной для проведения исследований.

Полученные в ходе работы покоящиеся овоидные клетки *Mtb* сохраняют инфекционный потенциал и могут быть реактивированы *in vivo* с развитием туберкулезного заболевания при снижении иммунного статуса животного. Эти клетки соответствуют всем предъявляемым критериям для возбудителя латентного ТБ. Полученные покоящиеся формы *Mtb* не размножаются; характеризуются низкой активностью метаболизма; обладают устойчивостью к антибиотикам (в том числе к рифампицину); для них характерна «некультивируемость» на стандартных плотных средах; способны к длительному хранению в условиях стресса; имеются выраженные изменения морфологии; способны к реактивации.

Полученные в настоящей работе покоящиеся микобактерии, способные выживать в течение длительного времени в условиях стресса, являются хорошим инструментом для выявления механизмов перехода таких форм бактерий к активному состоянию, что может прояснить механизмы реактивации латентного ТБ. Этой проблеме посвящен следующий раздел работы.

3.3. Реактивация покоящихся микобактерий.

Ранее было обнаружено, что филогенетически связанная с микобактериями неспорообразующая бактерия *Micrococcus luteus* способна образовывать покоящиеся формы (Kaprelyants and Kell, 1993), которые были не способны к росту на плотных и жидких средах. Однако при внесении супернатанта, полученного из активно растущих культур, в среду реактивации такие формы вновь восстанавливали способность к размножению. Было продемонстрировано, что активно растущие клетки *M. luteus* секретируют в среду роста белок Rpf, который промотирует реактивацию покоящихся бактерий и стимулирует размножение активных бактерий (Kaprelyants et al., 1993). Гены этих белков были обнаружены и в геноме микобактерий. Было продемонстрировано, что Rpf является пептидогликангидролазой и способен гидролизовать гликозидную связь между N-ацетил глюкозамина и N-ацетил мурамовой кислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Однако, каким образом эта активность связана с реактивацией не ясно. Выяснилось, что Rpf-зависимый механизм реактивации *in vivo* может происходить при условии наличия некоторого числа остаточных метаболически активных бактерий в популяции покоящихся форм, поскольку синтез белка Rpf отсутствует в нерепликативном состоянии. Это требование трудновыполнимо в реальной ситуации, поскольку количество микобактерий в организме животного или человека с латентным ТБ может быть очень низким. Вероятно, в организме хозяина имеются другие факторы реактивации, которые могут включать компоненты клеточных стенок, низкомолекулярные

вещества, факторы иммунной системы. Мы предположили, что начало процесса реактивации может быть связано с более простыми, чем Rpf, индукторами, являющимися продуктами метаболизма микобактерий или организма хозяина. Однако до сих пор такие инициаторы реактивации микобактерий не были обнаружены. Известно, что возбудитель ТБ, находясь в организме, в качестве источника углерода использует липиды хозяина (Miner et al., 2009), поэтому поиск индукторов реактивации липидной природы представляется перспективным. С другой стороны, биохимические процессы, происходящие после индукции перехода ПМ в активное состояние практически не известны, и требуют экспериментального изучения.

Для изучения механизма реактивации покоящихся микобактерий в работе была использована разработанная нами ранее модель получения «некультивируемых» клеток *Msm* в течение 72-96 часов в условиях недостатка калия (Shleeva et al., 2004). Полученные данные были апробированы на модели получения покоящихся «некультивируемых» форм *Mtb* в условиях постепенного закисления среды в стационарной фазе развития культуры.

Как уже говорилось выше, нами выявлены три стадии метаболического покоя микобактерий (Таблица 12). Очевидно, что вторая и третья стадии покоя являются характерными для возбудителя латентного ТБ, поскольку бактерии этих стадий являются «некультивируемыми» на плотных средах. Полученные в нашей работе покоящиеся микобактерии, способные выживать в стадии глубокого покоя, являются хорошим инструментом для выявления механизмов перехода таких форм бактерий к активному состоянию и может пролить свет на механизмы реактивации латентного ТБ, что относится к значимому направлению фундаментальной микробиологии и имеет важное значение для медицины и охраны окружающей среды.

Для экспериментов по изучению механизмов реактивации использовали ПМ, находящиеся на третьей стадии покоя, которые характеризовались сниженной способностью к самореактивации в свежей жидкой среде.

Таблица. 12. Стадии метаболического покоя микобактерий.

покоящиеся клетки микобактерий			КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ
1-я стадия покоя	2-я фаза покоя	3-я фаза покоя	
<i>обратимая</i>	<i>обратимая</i>	<i>обратимая</i>	
Низкая метаболическая активность, ПМ способны к самореактивации на плотных и жидких средах	Низкая метаболическая активность, «некультивируемость» на плотных средах, способны к самореактивации в жидких средах	«Некультивируемые», еще интактные клетки, не способны к реактивации на плотных и жидких средах, требуется наличие внешних стимулирующих факторов	

3.3.1. Роль трегалозы/трегалазы в реактивации покоящихся микобактерий.

Было обнаружено, что при реактивации покоящихся микобактерий, хранившихся в течение 3.5 - 5 месяцев в закисленных культурах при комнатной температуре, в свежей жидкой среде наблюдается выраженная лаг фаза (до 6 - 8 часов). Очевидно, что в этот момент не происходит активных биосинтетических процессов, что следует из отсутствия дыхания бактерий (Nikitushkin, 2020), отсутствия синтезов белков и РНК (Рис. 62). Можно предположить, что в этой фазе происходят некие катаболические процессы, включающие запасенные в покоящихся клетках эндогенные метаболиты. Поскольку в ПМ было обнаружено значительное количество трегалозы, было оценено количество этого метаболита в клетках *Msm* в процессе реактивации. Действительно, уровень трегалозы снижается в начальный период реактивации (1 - 5 ч) (Рис. 63), что происходит задолго до начала синтезов РНК (8 - 12 ч) (Рис. 62), при этом наблюдается резкий подъем концентрации глюкозы. Дальнейшее падение глюкозы (Рис. 63) скорее всего связано с ее утилизацией в путях метаболизма, возможно в гликолитическом пути. Очевидно, снижение концентрации трегалозы связано с ее гидролизом с

образованием глюкозы. Уровень трегалозы продолжал падать вплоть до начала деления микобактерий (~24 ч), которое регистрировали методом КОЕ.

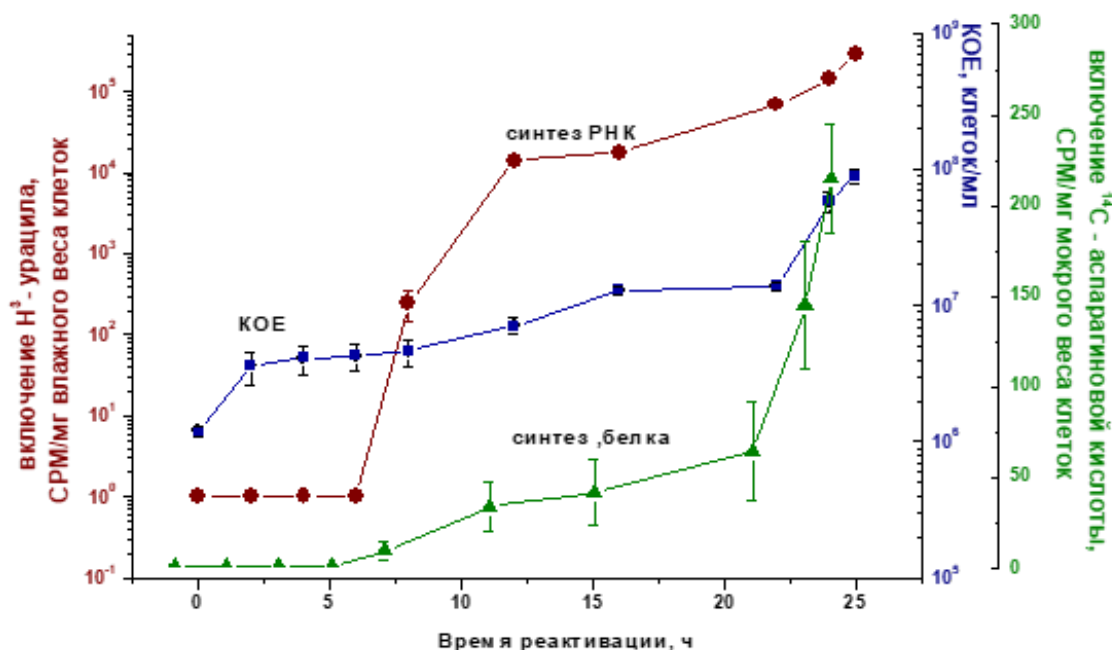


Рис. 62. Реактивация покоящихся клеток *M. smegmatis*: А) уровень КОЕ (квадраты), синтезов РНК (включение H^3 -урацила) (кружки) и белка (треугольники). ПМ хранились 3.5-4.5 месяцев в статических условиях без доступа кислорода. Эксперимент выполнен в трех биологических повторностях. Показан типичный эксперимент. Бары соответствуют $\pm$ стандартное отклонение.

После начала размножения реактивированных микобактериальных клеток количество внутриклеточной трегалозы соответствует уровню трегалозы в активно растущих микобактериях логарифмической фазы роста (0.2 – 0.5 мкг/мг влажного веса бактерий). Несомненно, снижение уровня внутриклеточной трегалозы происходит вследствие ее гидролиза с образованием глюкозы, концентрация которой увеличивается в первые часы реактивации (Рис. 63). Концентрация внутриклеточной глюкозы также снижалась после пяти часов реактивации пока не достигла уровня глюкозы в активно растущих микобактериях (~ 0.2 мкг/мг влажного веса бактерий). По всей вероятности, уменьшение концентрации глюкозы в реактивирующихся микобактериальных клетках происходит благодаря функционированию гликолитического пути и запуску метаболизма в целом.

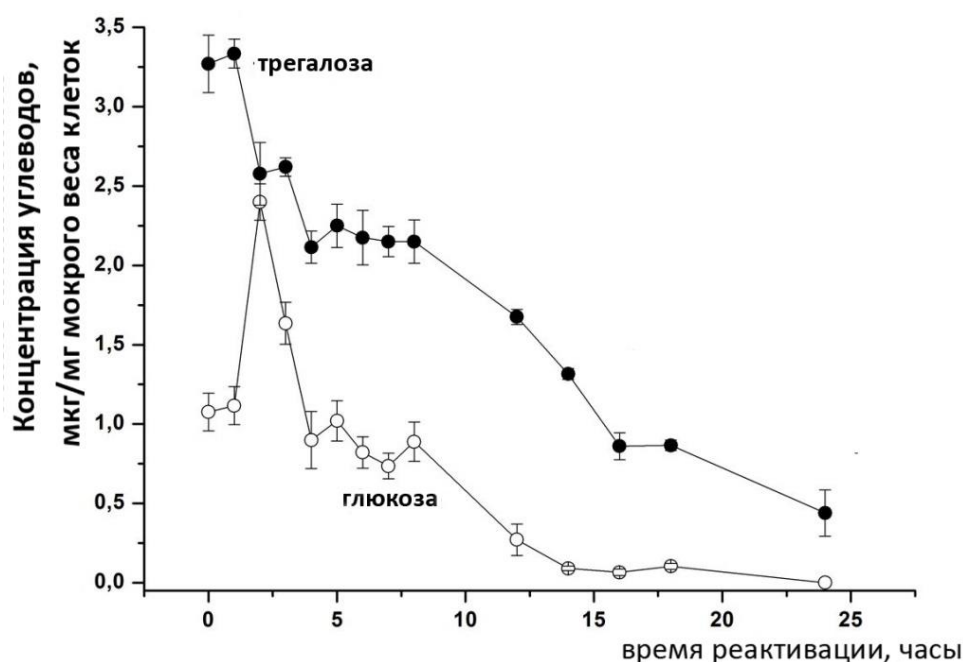


Рис. 63. Динамика уровня внутриклеточной трегалозы (закрашенные символы) и глюкозы (пустые символы) в покое и при реактивации *M. smegmatis*. ПМ хранились 3,5-4,5 месяцев в статических условиях без доступа кислорода. Эксперимент выполнен в трех биологических повторностях. Показан типичный эксперимент. Бары соответствуют $\pm$ стандартное отклонение.

Поскольку гидролиз трегалозы находится под контролем фермента трегалазы, мы проследили за активностью этого фермента в процессе реактивации. Действительно, в начале реактивации (через 2 часа) происходит значительное увеличение активности трегалазы (Рис. 64), которое коррелирует с всплеском глюкозы и быстрым снижением концентрации трегалозы (Рис. 63). Затем активность трегалазы снижалась и вскоре (через 5-7 часов) снова увеличивалась. Третий подъем активности трегалазы (через 24 часа) совпал с началом размножения микобактерий (Рис. 64) и эта активность в дальнейшем поддерживалась на постоянном уровне в течение логарифмической фазы роста.

Для того, чтобы понять почему происходит такая флуктуация в активности трегалазы, мы изучили этот фермент в экстрактах активных и покоящихся микобактерий *in vitro*.

Интересно, что в активных клетках активность трегалазы (оцененная по количеству высвобожденной глюкозы) детектировалась сразу после добавления субстрата, в то время как в случае трегалазы из покоящихся

бактерий проявилась значительная лаг-фаза, после которой началась активная деградация трегалозы (Рис. 65а). Это демонстрирует самоактивацию этого фермента *in vitro* по не вполне понятному в настоящий момент механизму. В случае предварительной трехчасовой инкубации грубого экстракта покоящихся микобактерий при комнатной температуре лаг-фаза нивелировалась и после добавления субстрата начиналась реакция гидролиза трегалозы (Рис. 65в).

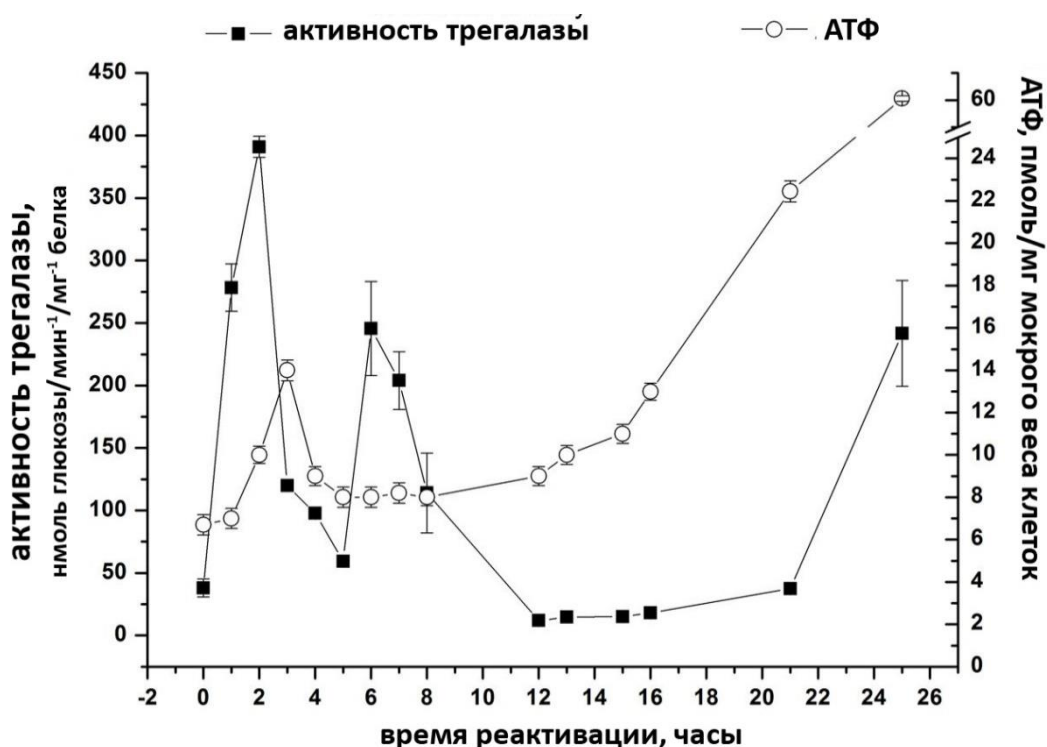


Рис. 64. Динамика изменения активности трегалазы и концентрации АТФ в реактивирующихся клетках *M. smegmatis* из состояния покоя. Эксперимент проведен в 3-х биологических повторностях. Бары соответствуют $\pm$ стандартное отклонение.

Ранее было обнаружено, что активность трегалазы в активно растущих клетках *Msm* ингибируется в присутствии 20 мМ АТФ (Carroll et al., 2007). В связи с этим было проведено тестирование влияния широкого диапазона концентраций АТФ на активность трегалазы, полученной из покоящихся микобактерий. Было выявлено, что небольшие концентрации АТФ (2мМ) предотвращают такую активацию этого фермента (Рис. 65а). При этом трегалаза из активных микобактерий оставалась толерантной к этим

концентрациям АТФ и ее активность ингибировалась только в присутствии 20 мМ АТФ.

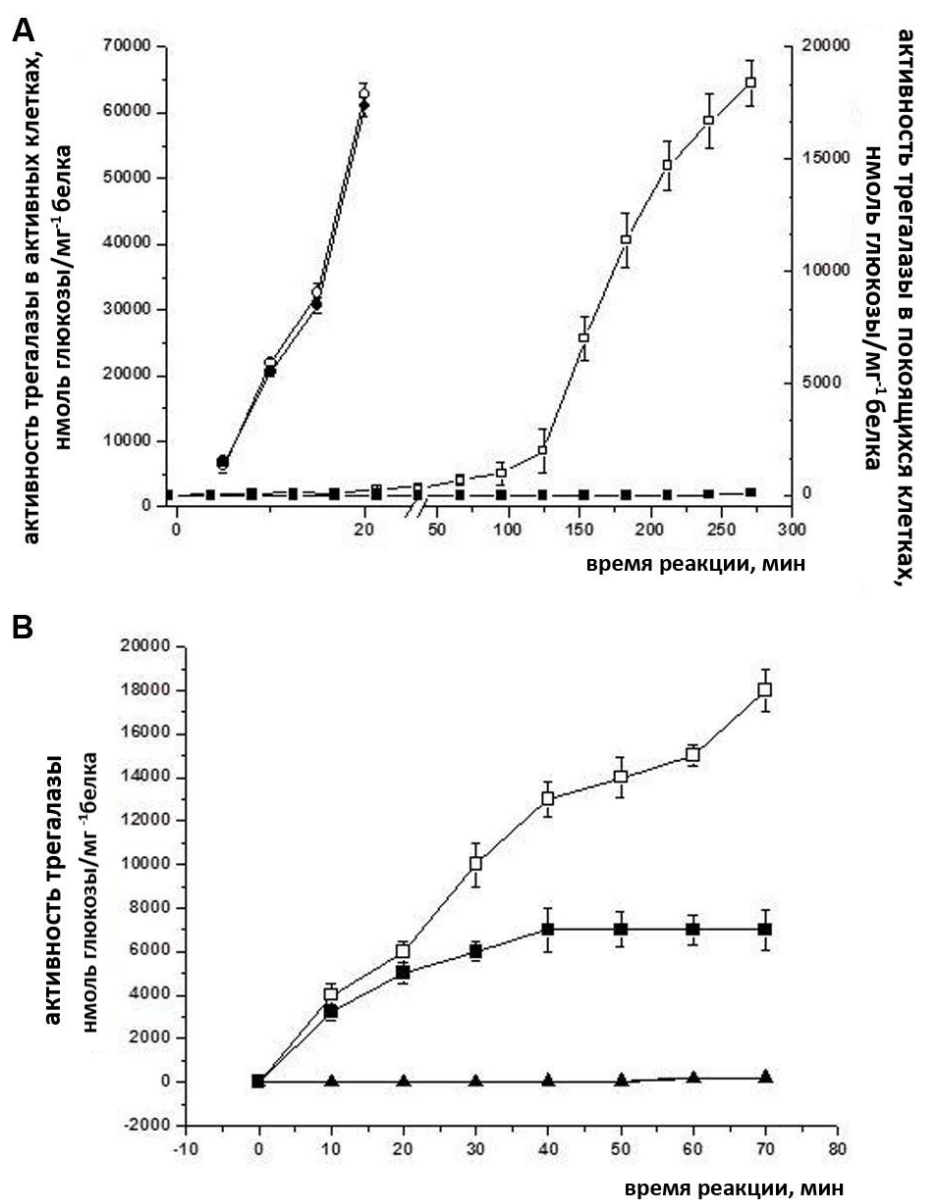


Рис. 65. Способность трегалазы из покоящихся микобактерий к самоактивации *in vitro*. ● - активность трегалазы из активно растущих микобактерий, ■ – активность трегалазы из покоящихся микобактерий; открытые символы - без АТФ, закрашенные символы – в присутствии 2 мМ АТФ в реакционной смеси. А - Реакцию проводили сразу после получения экстракта бактерий. В – Экстракт микобактерий предварительно инкубировали 3 часа при комнатной температуре без (кружки) или с добавлением 2 мМ АТФ (треугольники). Этот эксперимент был повторен пять раз. Представлен типичный эксперимент. Бары соответствуют $\pm$ стандартному отклонению.

Таким образом, флуктуации в активности трегалазы при реактивации покоящихся микобактерий можно объяснить активацией этого фермента связанной с флуктуациями концентрации внутриклеточного АТФ.

Действительно, мы видим, что при повышении уровня АТФ (через 2 ч) в начале реактивации, снижается активность трегалазы и наоборот (Рис. 64). Когда начинается активный рост (24 ч) трегалаза утрачивает чувствительность к низким концентрациям АТФ, что похоже на ситуацию с активными бактериями. Даже в случае предварительной 3-х часовой активации трегалазы этот фермент сохраняет частичную чувствительность к присутствию 2 мМ АТФ (Рис. 65в).

Было выявлено, что хранившиеся в течение 4-х месяцев покоящиеся ОК *Msm* содержат глюкозу и АТФ на низком, но детектируемом уровне.

Таким образом, можно предположить, что такая чувствительность трегалазы покоящихся микобактерий к низким концентрациям АТФ обеспечивает поддержание внутриклеточной концентрации АТФ на низком, но постоянном уровне в период покоя по механизму обратной связи (Рис. 66). Так, если концентрация АТФ сильно снижается (меньше, чем 2 мМ), то она восполняется за счет гидролиза трегалозы с образованием глюкозы и АТФ (Рис. 66) 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, а условия для дальнейшей реактивации не благоприятны, происходит ингибирование трегалазы (Рис. 66), и снижение уровня АТФ до поддерживающих значений. Такой механизм обратной связи может регулировать энергетические потребности ПМ и минимальный метаболизм в условиях длительного хранения при отсутствии синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании.

Несмотря на то, что медленное потребление трегалозы может быть важным событием для выживания бактерий в условиях голодания (Kalscheuer and Koliwer-Brandl, 2014), полученные при закислении среды покоящиеся микобактерии содержались в избытке глицерина, что указывает на защитную роль трегалозы в период хранения ПМ. Значительная роль внутриклеточной трегалозы для поддержания жизнеспособности ПМ была продемонстрирована

выше в экспериментах, в которых путем молекулярно-биологических манипуляций изменяли уровень внутриклеточной трегалозы в ПМ.

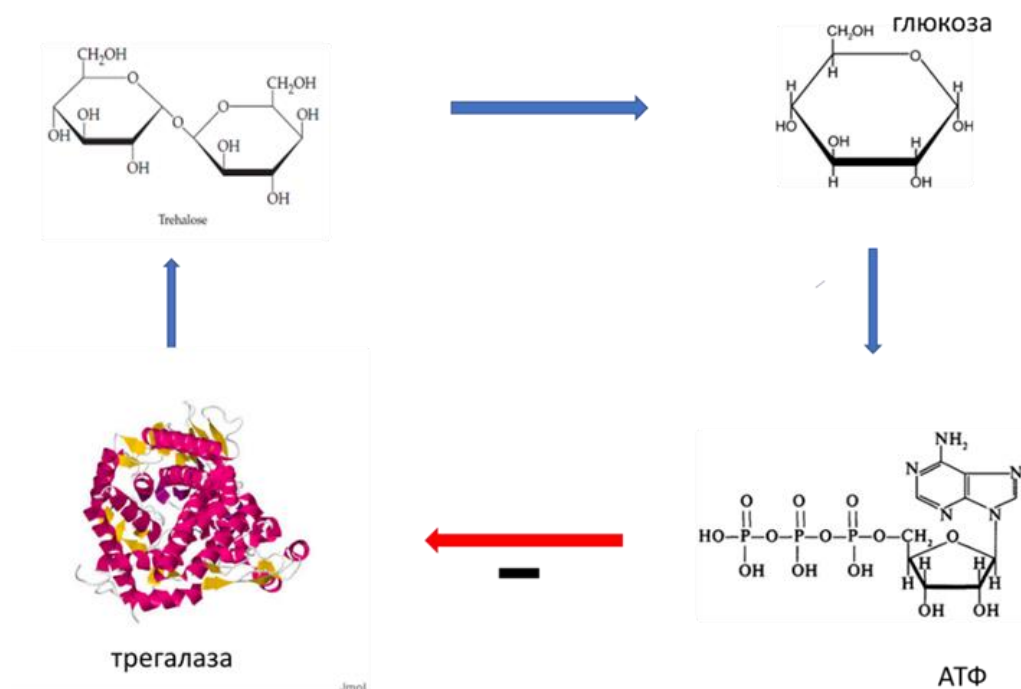


Рис. 66. Механизм обратной связи поддержания постоянного уровня АТФ в покоящихся микобактериях.

Выявленные изменения количества трегалозы и активности гидролизующего ее фермента (трегалазы) в процессе реактивации ПМ указывают на важность гидролиза этого дисахарида на ранней стадии реактивации (0-12 ч). Для подтверждения участия трегалазы в реактивации ПМ был использован ингибитор трегалаз (в том числе бактериальных) валидамицин А (VM-A) (Li et al., 2012). Было выявлено, что VM-A ингибирует трегалазу активно растущих микобактерий *in vitro* при концентрациях выше 1 мкМ (Рис. 67). Было оценено влияние VM-A на скорость реактивации покоящихся ОК *Msm*. Было обнаружено, что в присутствии VM-A в среде наблюдается выраженное замедление процесса реактивации и деления клеток (Рис. 68а). Оказалось, что популяция покоящихся микобактерий состоит из двух типов бактериальных клеток – покоящиеся культивируемые (т.е. способные расти на плотных средах и оцененные по КОЕ) и «некультивируемые» (отсутствует способность к росту на плотных средах, но могут реактивироваться в жидких средах и их количество определяется

методом НВЧК). Разница между КОЕ и НВЧК позволяет выявить количество «некультивируемых» бактерий в общей популяции клеток и оценить влияние VM-A на каждую часть популяции.

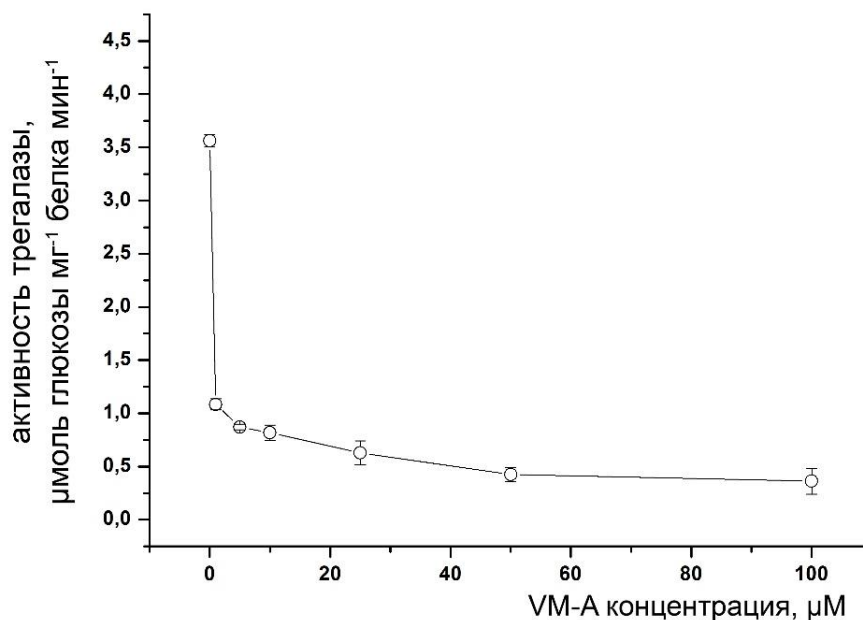


Рис. 67. Влияние ингибитора трегалазы VM-A на активность трегалазы в грубом экстракте активно растущих клеток *M. smegmatis*. Бары соответствуют стандартной погрешности из трех биологических повторностей.

В случае покоящихся ОК *Msm*, хранившихся в статических условиях 1.5 года разница между КОЕ и НВЧК составляла 10^2 - 10^3 клеток/мл, что означало, что данная культура ПМ на 99 – 99.9 % состояла из «некультивируемых» клеток. При возрастании количества VM-A в жидкой среде уменьшалось количество «некультивируемых» бактерий, способных к реактивации. При концентрации VM-A 5 мг/мл значение НВЧК и КОЕ практически совпадали (Рис. 68в). Подобное количество VM-A не оказывало никакого влияния на рост активных микобактерий ранней стационарной фазы, для которых НВЧК совпадало с КОЕ (Рис. 68в). Очевидно, деградация трегалозы важна для реактивации ПМ, особенно необходима для «некультивируемых» ОК *Msm*. Таким образом, развитие видимого роста ПМ, оцененного по ОП (OD) при реактивации присутствии VM-A происходит за счет культивируемой части популяции клеток (Рис. 68а).

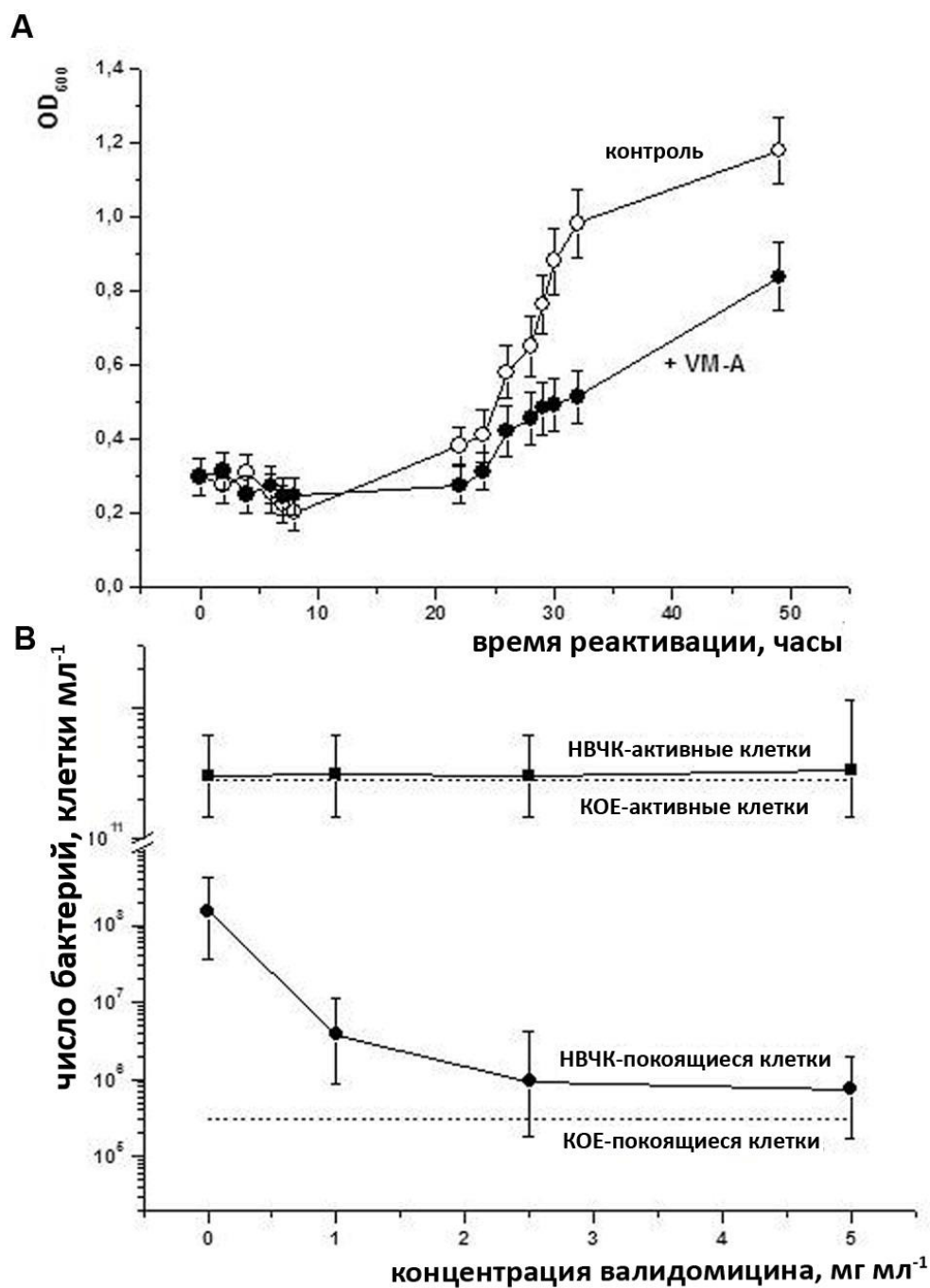


Рис. 68. Реактивация покоящихся ОК *M. smegmatis* в присутствии ингибитора трегалаз.

А - Реактивацию ПМ проводили в колбах +/- ингибитор трегалазы валидомицин А.

В - НВЧК анализ количества реактивированных ПМ в присутствии разных концентраций валидомицина А. Штриховая линия демонстрирует число КОЕ для культур в начале эксперимента. Эксперимент проведен в 4-х биологических повторностях. Бары соответствуют 95% доверительным интервалам (А) для метода НВЧК и стандартному отклонению для OD (В).

В связи с тем, что VM-A способен влиять на активность фермента TreS (Kalscheuer et al., 2010), были проведены измерения количества мальтозы в

клетках реактивирующихся микобактерий. Выявлено, что во время первых суток реактивации уровень мальтозы не изменялся как в присутствии VM-A, так и без него (Рис. 69). В этом случае наблюдается выраженное снижение уровня глюкозы в присутствии валидомицина на ранней стадии реактивации (2 - 6 ч), в отличие от контроля без VM-A когда концентрация глюкозы в этот период возрастает. Подобный эффект указывает на ингибирование трегалазы в присутствии валидомицина и вероятное расходование запасенной глюкозы реактивирующимися бактериями. Поскольку уровень мальтозы в этом эксперименте не изменялся, можно сказать, что путь TreS не активен в ранней фазе реактивации, а валидомицин ингибирует исключительно трегалазу в этот период активации ПМ.

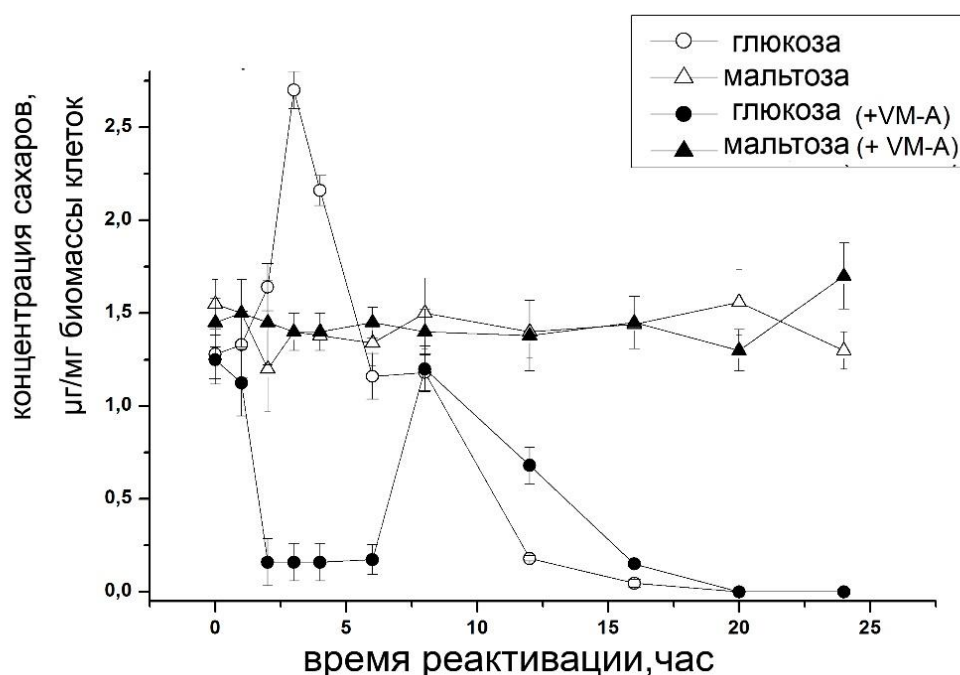


Рис. 69. Оценка количества глюкозы и мальтозы в реактивирующейся культуре *M. smegmatis*. Бары соответствуют стандартному отклонению 3-х биологических повторностей.

Таким образом, мы выявили, что снижение концентрации внутриклеточной трегалозы и активация трегалазы в период начальных стадий реактивации ПМ сходны с процессом, происходящим при прорастании спор актиномицетов и дрожжей (Hey-Ferguson et al., 1973). Так же, как в спорах дрожжей (Thevelein et al., 1982; Thevelein and Jones, 1983), активность

трегалазы при реактивации покоящихся ОК *Msm* существенно повышается во время первых часов реактивации, затем происходит резкое снижение активности этого фермента. По всей видимости, активация трегалазы не является следствием синтеза этого белка *de novo*, так как трансляционные процессы активируются в более поздних фазах реактивации ПМ и детектируются после 12 – 14 часов после засева клеток в свежую жидкую среду. Кроме этого, наблюдается самоактивация трегалазы в течение 2-х часов в грубом экстракте белков ПМ, в условиях, при которых биосинтез белка не осуществим.

Вероятно, активность трегалазы ингибируется в ПМ подобно ситуации в аскоспорах дрожжей (Thevelein, 1984). Имеется два возможных объяснения механизма этого эффекта: 1. на активность трегалазы могут влиять низкомолекулярные факторы, например, известно АТФ-зависимое ингибирование фермента или активация через фосфорилирование (Ortiz et al., 1983); 2. влияние уровня гидратации спор на активность трегалазы (McBride and Ensign, 1990). В нашем случае, вероятно, активность трегалазы регулируется путем изменения уровня АТФ в клетке, так как активность этого фермента, выделенного из покоящихся микобактерий, ингибируется низкой концентрацией АТФ *in vitro*. Нельзя исключить вклад гидратации ПМ в активацию трегалазы на начальной фазе реактивации, что может приводить к уменьшению концентрации внутриклеточного АТФ и вследствие этого происходит активация трегалазы. В настоящее время остается неясным, почему имеется разная чувствительность к АТФ у трегалазы, выделенной из активно растущих микобактерий и трегалазы из ПМ. Однако, присутствие трегалазы в агрегированной форме в ПМ, в отличие от активно растущих клеток, может влиять на чувствительность этого фермента к АТФ.

Таким образом, активация трегалазы на ранних стадиях реактивации ПМ сопровождается снижением уровня трегалозы и возрастанием концентрации глюкозы, которая может использоваться клеткой пока не произошла полная активация метаболизма. Биологическая роль распада трегалозы на ранних

стадиях реактивации ПМ не вызывает сомнений. А гидролизующая ее трегалаза может рассматриваться в качестве мишени для создания антитуберкулезных средств.

3.3.2. Факторы реактивации липидной природы.

Ранее было продемонстрировано, что рост длительно хранившихся в стационарной фазе роста клеток *Mtb* можно стимулировать введением в среду роста фосфолипидов (Zhang et al., 2001). Однако в данной работе не был описан механизм этого явления. Мы исследовали влияние фосфолипидов различного состава на реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm*, полученных в условиях недостатка калия (Shleeва et al., 2004). Покоящиеся «некультивируемые» микобактерии инокулировали в свежую жидкую среду, включающую калий и разные количества липидов, действие которых на стимуляцию реактивации ПМ оценивали методом НВЧК.

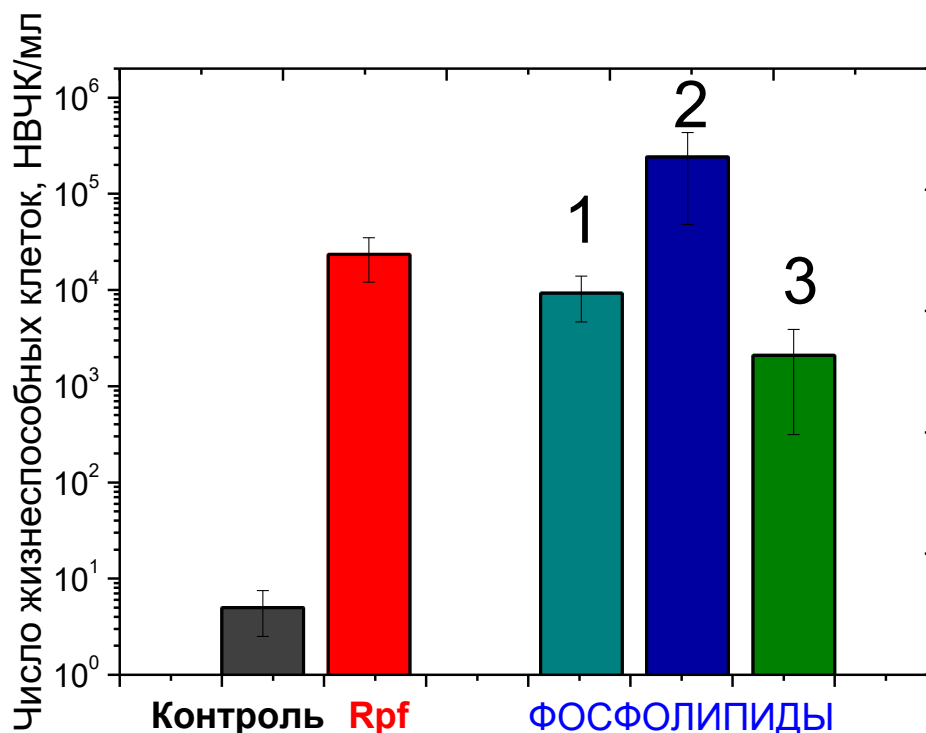


Рис. 70. Реактивация покоящихся форм *M. smegmatis* фосфолипидами и белком Rpf. Контроль – реактивация ПМ в жидкой среде без активирующих агентов; Rpf – к среде реактивации добавлен белок Rpf (5 нг/мл), 1-3 внесение в среду реактивации 200 мкг/мл фосфолипидов: 1 – фосфатидилхолина, 2 – кардиолипина, 3 – лизо-фосфатидилхолина.

Было выявлено, что в присутствии 200 мкг/мл кардиолипина, фосфатидилхолина или лизо-фосфатидилхолина происходит стимуляция процесса реактивации, как в случае использования 5 нг/мл Rpf (Рис. 70). Так как единым компонентом использованных фосфолипидов являются остатки жирных кислот (ЖК), было оценено влияние свободных ЖК различной длины в отношении стимуляции реактивации покоящихся форм *M. smegmatis*. Эти эксперименты показали, что ЖК с одной или несколькими ненасыщенными связями действительно стимулируют реактивацию бактериальных клеток аналогично белку Rpf.

Было обнаружено, что присутствие 3.5 мкМ свободных ненасыщенных жирных кислот (СНЖК) в среде роста с концентрацией «некультивируемых» бактерий 10^6 клеток/мл стимулировало реактивацию ПМ (Рис. 71). Скорость реактивации детектировали по изменению показателя оптической плотности суспензии клеток при длине волны 600 нм. Активность была зависимой от концентрации ЖК с оптимумом 2–10 мкМ (Рис. 72).

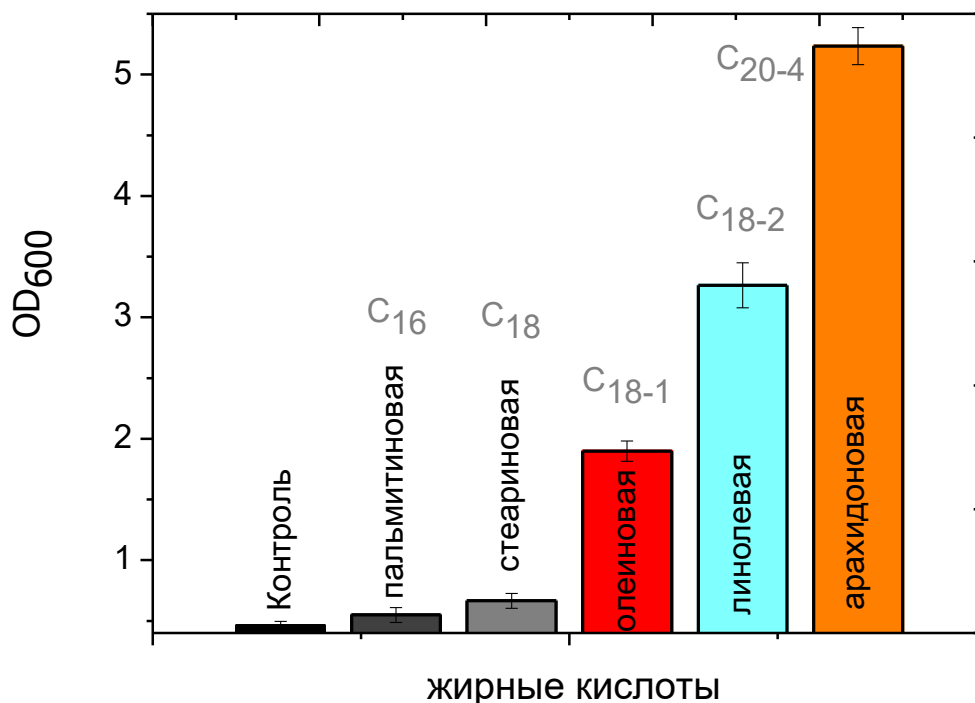


Рис. 71. Эффект жирных кислот (в концентрации 3.5 мкМ) на реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Реактивацию ПМ проводили в 50% среде Сотона с содержанием 0.6% глицерина в присутствии 0.025% дрожжевого экстракта.

Добавление 1.5 мкМ линолевой кислоты в реактивационную среду приводило к восстановлению $\sim 10^5$ клеток/мл по сравнению только с 10^3 клеток/мл в контрольном образце (Рис. 73).

Эффект СНЖК и фосфолипидов в отношении реактивации ПМ зависел от их концентрации и имел место выраженный оптимум (Рис. 72). При этом интервал действующих концентраций олеиновой кислоты (1.8 – 10.6 мкМ) находился в области меньших концентраций по сравнению с фосфолипидами (7.5 - 36.6 мкМ). Очевидно, это указывает на то, что именно СНЖК ответственны за реактивирующий эффект, а фосфолипиды выступают в роли их источников (возможно, за счет действия бактериальных фосфолипаз и эстераз).

Поскольку известно, что ЖК являются эффективными разобщителями окислительного фосфорилирования в бактериальных клетках (Desbois and Smith, 2010), мы провели эксперименты по реактивации в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования – протонофора СССР, который активен в *M. smegmatis* (Tran et al., 2005). В связи с этим было высказано предположение о том, что частичное снятие мембранного потенциала увеличивает латеральную диффузию липидов, что может приводить к реактивации ПМ. Однако эксперименты показали, что СССР не способен стимулировать реактивацию в широком диапазоне концентраций до 1 мкМ (максимальная концентрация СССР, которая не влияет на рост жизнеспособных бактерий) (Рис. 73). Этот эксперимент исключает возможную роль разобщающего действия свободных жирных кислот при реактивации ПМ. Кроме того, увеличение концентрации СССР до 1 мкМ приводило к снижению количества жизнеспособных ПМ. А при внесении 4 мкг/мл олеиновой кислоты в среду роста наблюдалось ингибирование реактивации ПМ и роста активно растущих микобактерий. Очевидно, что в присутствии низких концентраций ЖК запускаются иные механизмы в клетках микобактерий, не связанные с разобщением окислительного фосфорилирования.

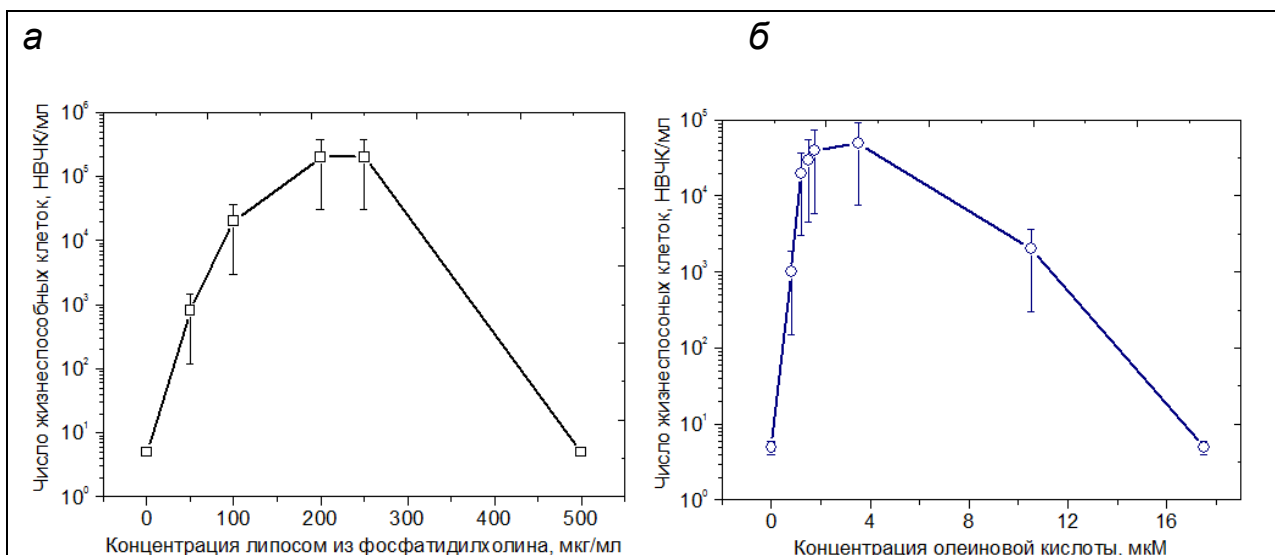


Рис. 72. Эффект различных концентраций липосом из фосфатидилхолина (а) и олеиновой кислоты (б) на реактивацию «некультивируемых» форм *M. smegmatis*. Реактивацию ПМ проводили в 50% среде Сотона с содержанием 0.5% глицерина в присутствии 0.025% дрожжевого экстракта. На оси ординат – число жизнеспособных клеток (НВЧК/мл).

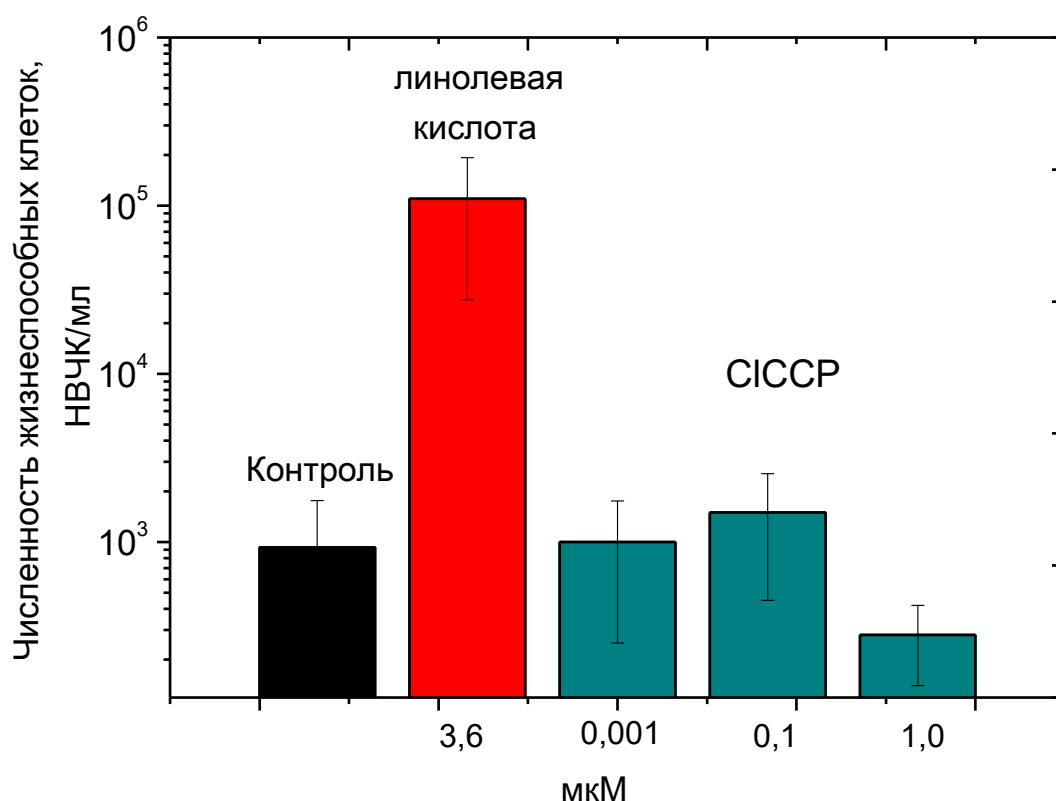


Рис. 73. Сравнение влияния линолевой кислоты и разбавляющего агента СССР на реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Реактивацию ПМ проводили в формате НВЧК. В каждое разведение добавляли линолевую кислоту или СССР в указанных концентрациях. По ординате показано количество потенциально жизнеспособных (реактивированных) клеток на мл исходной популяции бактерий. Этот эксперимент был повторен дважды с аналогичными результатами; бары представляют стандартную ошибку среднего. Звездочки указывают на то, что результат значительно отличается от контроля по критерию Стьюдента.

Поскольку, в результате тестирования разных веществ липидной природы на наличие стимулирующего эффекта в отношении реактивации ПМ, было установлено, что добавление СНЖК к среде реактивации в концентрациях 2 – 10 мкМ вызывает инициирование реактивации (Рис. 74). Принимая во внимание тот факт, что ЖК были активны при очень низком уровне концентрации (несравнимых с концентрациями «питательных» субстратов), более того, наблюдалась специфичность их строения в отношении реактивирующей способности (активны только ненасыщенные ЖК), их сигнальная роль в реактивации ПМ представляется правдоподобной.



1

2

Рис. 74. Стимулирование реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*, в присутствии 1 мкг/мл олеиновой кислоты.

Культивирование в течение 4-х суток.

1 – контроль, без олеиновой кислоты;

2 – + 1 мкг/мл олеиновой кислоты.

Таким образом, мы обнаружили, что экзогенно добавленные свободные ненасыщенные жирные кислоты вызывают реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm*, полученных в стационарной фазе после культивирования в условиях недостатка калия. Zhang с соавторами ранее сообщали о реактивации истощенных клеток *Mtb* в присутствии фосфолипидов (Zhang et al., 2001). Активными веществами в их экспериментах также могли быть жирные кислоты, полученные из фосфолипидов вследствие действия эстераз и фосфолипаз. Однако это предположение не соответствует выводам автора о том, что реактивационная активность была нивелирована после расщепления фосфолипидов фосфолипазой A2 (Zhang et al., 2001). Это очевидное

несоответствие может возникнуть из-за того, что вследствие действия фосфолипазы A2 могут образовываться слишком большие неконтролируемые количества ЖК, которые, как было нами установлено, могут ингибировать рост микобактерий, возможно вследствие разобщения окислительного фосфорилирования. Мы показали, что для достижения наблюдаемого эффекта реактивации необходима оптимальная концентрация СНЖК, а более высокие концентрации неэффективны или даже тормозят этот процесс (Рис. 72). Альтернативные источники ЖК могут присутствовать в условиях организма хозяина. Например, Daniel с соавторами. показали, что триацилглицеролы (ТАГ) накапливаются в нерепликативных клетках *Mtb* в условиях гипоксии как *in vitro* (Daniel et al., 2004), так и в макрофагах (Daniel et al., 2011). Мы предполагаем, что ТАГ могут быть использованы в качестве источника внутриклеточных ЖК после гидролиза ТАГ в начале реактивации. Интересно, что в работе Daniel и др. свободные ЖК хозяина используются для формирования ТАГ в клетках *Mtb* во время перехода в состояние покоя (Daniel et al., 2011). В течение этого периода клетки метаболически активны; ЖК используются во время перехода из активного состояния в состояние покоя, но не в состоянии покоя как таковом (когда клетки не являются метаболически активными, по определению). Следовательно, ЖК могут участвовать как в образовании покоящихся клеток (в качестве метаболических субстратов), так и в их реактивации (в качестве триггерного фактора).

Низкие активные концентрации ЖК и их химическая специфичность (то есть активность ненасыщенных ЖК) позволяют предположить, что они могут играть сигнальную роль в процессе реактивации. Роль ЖК в качестве источника питания может быть исключена, так как среда реактивации содержит все соединения, необходимые для активного роста бактерий, и в любом случае ее достаточно для Rpf-зависимой реактивации (Shleeva et al., 2004). Известно, что ЖК участвуют в различных сигнальных каскадах микроорганизмов. Например, арахидоновая кислота служит хемоаттрактантом для *Dictyostelium discoideum* (Schaloske et al., 2007), а ЖК

служат сигналами для дифференцировки *Mycobacterium xanthus* (Downward and Toal, 1995). При более высокой концентрации олеиновая кислота вызывает прорастание конидий *Entomophthora culicis* (Kerwin, 1982). В нашей работе впервые установлено, что реактивация «некультивируемых» микобактерий запускается ненасыщенными ЖК, включая арахидоновую кислоту. Существование оптимального диапазона концентраций для ЖК-индуцированной реактивации (Рис. 72б) можно объяснить токсическим эффектом ненасыщенных ЖК, которые провоцируют деградацию цитоплазматической мембраны при высоких концентрациях (Carson and Daneo-Moore, 1980). Для *Msm* токсический эффект олеиновой кислоты был обнаружен в концентрации выше 20 мкМ. В то же время олеиновая кислота (в форме добавки OADC или образующаяся вследствие деградации Твин- 80) является важным компонентом в ряде сред, разработанных для оптимального роста микобактерий (Dubos and Davis, 1946). Предположительно, любой возможный негативный эффект ЖК в ростовых средах микобактерий компенсируется присутствием бычьего сывороточного альбумина (БСА), который эффективно связывает избыток олеиновой кислоты. С другой стороны, это связывание может уменьшить концентрацию свободной олеиновой кислоты ниже уровня, необходимого для стимуляции реактивации «некультивируемых» бактерий (Рис. 72б). Поэтому для сред, содержащих OADC (0,2 мМ олеиновой кислоты и 60 мМ БСА), может потребоваться добавление экзогенных стимуляторов (например, белков Rpf) для восстановления «некультивируемых» клеток в популяции (Mukamolova et al., 2010).

Известно, что одним из регуляторных белков микобактерий, который «чувствует» ЖК во внешней среде, является аденилатциклаза. Гены, кодирующие этот белок, известны (У *Mtb* Rv2212 (Motaal et al., 2006), а у *Msm* - MSMEG_4279 (66% идентичности с Rv2212)). По-видимому, олеиновая кислота активирует этот фермент, что может приводить к увеличению концентрации цАМФ в клетке.

3.3.3. Вовлечение цАМФ в реактивацию покоящихся микобактерий.

Мы предположили, что АЦ, кодируемая геном *MSMEG_4279*, может быть вовлечена в передачу сигнала у *M. smegmatis*, и в этом случае реактивация будет вызвана повышением внутриклеточной концентрации цАМФ. Чтобы проверить это предположение, мы добавили цАМФ в среду реактивации в концентрации 3 мМ, которая достаточно высока для проникновения в клетки *Streptomyces coelicolor* (Süsstrunk et al., 1998) и *M. smegmatis* (Raychaudhuri et al., 1998). Это вызвало эффект реактивации, аналогичный тому, который наблюдался при добавлении 3мМ СНЖК (линоленовой и олеиновой) (Рис. 71). В тоже время добавление в среду реактивации цГМФ не привело к стимулированию реактивации ПМ *Msm*, что указывает на специфическое влияние цАМФ при переходе покоящихся бактерий в активное состояние. Увеличение концентрации цАМФ до 10 мМ не повлияло на эффект реактивации (Рис. 76). Дибутирил цАМФ – это более гидрофобная форма цАМФ, которая легче проникает в клетки и активна при более низких концентрациях (0,5–1 мМ) (Рис. 74). Более подробное исследование показало, что через день после начала реактивации, опосредованной олеиновой кислотой, внутриклеточная концентрация цАМФ резко возросла с 0–10 до 120–130 пмоль на 10^8 клеток/мл (Рис. 77). За этим увеличением последовало постепенное возобновление клеточного метаболизма, судя по включению радиоактивного урацила, но размножение клеток началось только через 72 часа после первоначального контакта с олеиновой кислотой (Рис. 77).

Добавление 8-бром-цАМФ (известного ингибитора АЦ (Virdy et al., 1999)) к среде реактивации полностью устранило реактивацию «некультивируемых» клеток (Рис. 75), что указывает на участие АЦ в этом процессе. В клетках ПМ *Msm*, инкубированных в среде реактивации без добавления ЖК, детектировался низкий уровень внутриклеточного цАМФ в течение всего периода реактивации (Рис. 78).

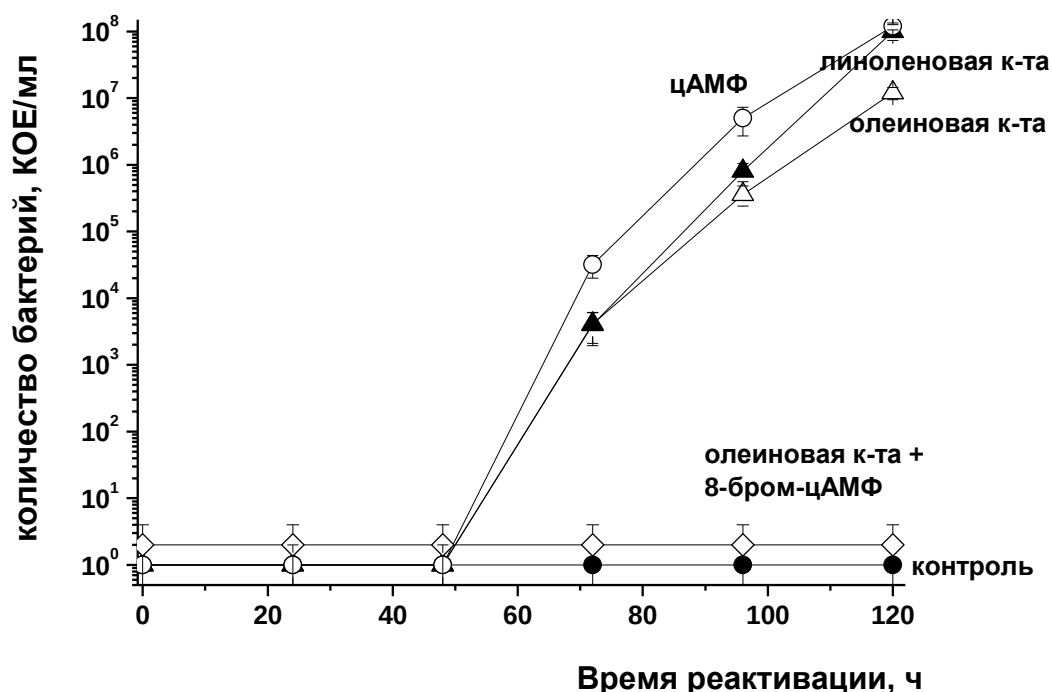


Рис. 75. цАМФ стимулирует реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Концентрации олеиновой кислоты, линолевой кислоты, цАМФ и 8-бром-цАМФ составляли 2 мМ, 1,7 мМ, 3 мМ и 2 мМ соответственно. Этот эксперимент был повторен три раза с аналогичными результатами; бары представляют стандартное отклонение.

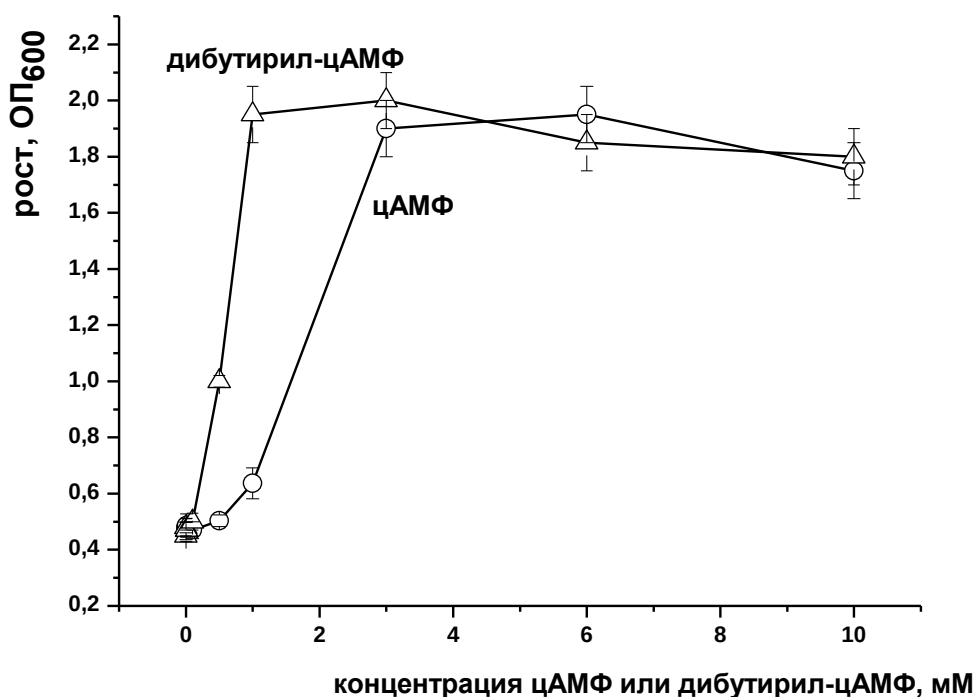


Рис. 76. Концентрационная зависимость цАМФ или дибутирил-цАМФ-опосредованной реактивации *M. smegmatis*. OD (600 нм) измеряли после 5 дней реактивации. Различные концентрации (0-10 мМ) цАМФ или дибутирил цАМФ были добавлены в начале реактивации. Этот эксперимент был повторен два раза с аналогичными результатами; бары представляют стандартное отклонение.

Аналогичные эксперименты по реактивации были выполнены с «некультивируемыми» покоящимися ОК *M. tuberculosis*, полученными после адаптации к постепенному подкислению ростовой среды в стационарной фазе. Несмотря на то, что эти культуры не содержали клетки, способные образовывать колонии на плотных средах, их можно было восстановить в жидкой среде, содержащей супернатант, полученный из культуры активно растущих бактерий. Как и в случае с *Msm*, реактивация «некультивируемых» клеток *Mtb* была вызвана добавлением экзогенно олеиновой кислоты (оптимальная концентрация около 10 мМ) или дибутирил-цАМФ (Рис. 79).

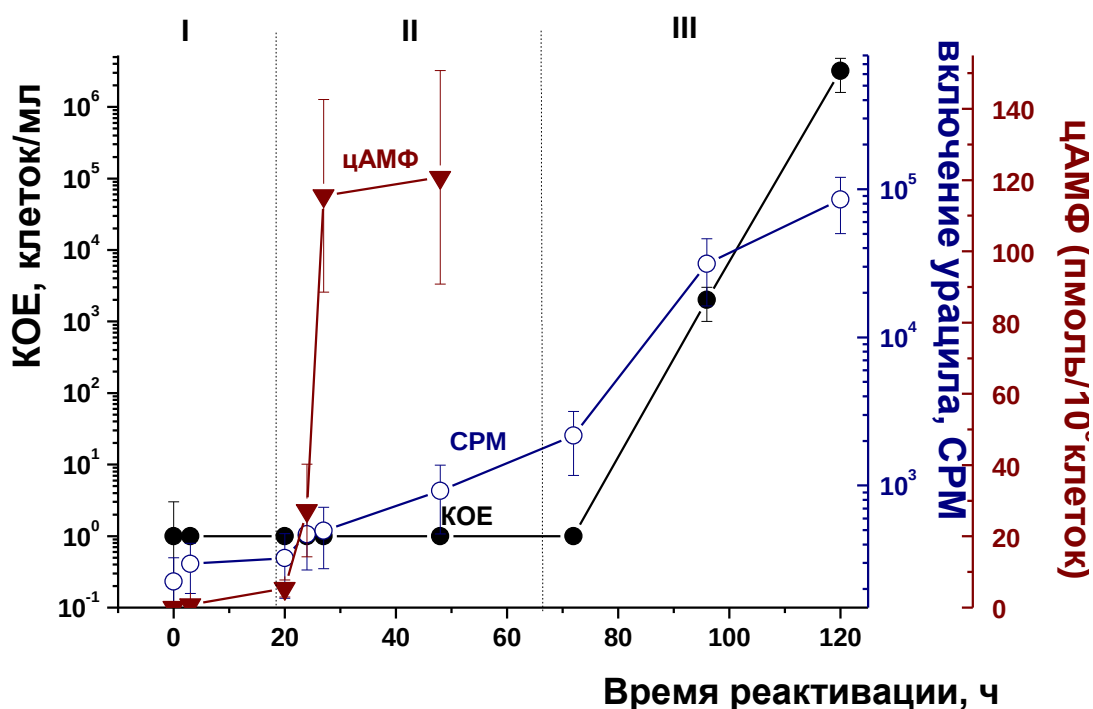


Рис. 77. Внутриклеточные уровни цАМФ и включения ³Н-урацила во время индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Олеиновую кислоту добавляли в концентрации 3,5 мМ. Внутриклеточный уровень цАМФ оценивали после того, как клетки собирали и разрушали. Метаболическую активность определяли с использованием включения ³Н - урацила (обозначено СРМ на оси рисунка). Пунктирные линии делят весь процесс на три фазы: I - истинная лаг фаза, II - метаболическая активация, III - размножение клеток. Этот эксперимент был повторен три раза с аналогичными результатами. Бары представляют стандартное отклонение.

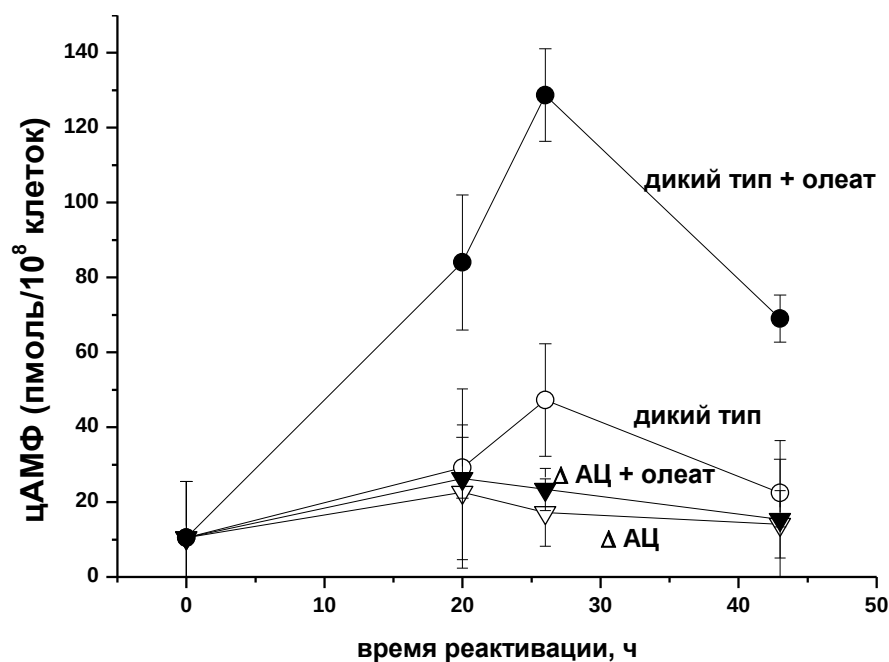


Рис. 78. Внутриклеточные уровни цАМФ во время индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* штаммов дикого типа и ΔАЦ. Олеиновую кислоту добавляли в концентрации 3,5 мкМ. Внутриклеточный уровень цАМФ оценивали после того, как клетки собирали и разрушали. Бары представляют стандартное отклонение.

Для экспериментов с *Mtb* в среду роста добавляли тилоксапол вместо твин-80. В отличие от клеток *Msm*, цАМФ не был активен в отношении покоящихся форм *Mtb*, по-видимому, из-за его плохого проникновения через клеточную оболочку, поскольку более гидрофобный дибутирил-цАМФ оказывал стимулирующий реактивацию эффект (Рис. 79б).

Чтобы подтвердить роль АЦ, был сконструирован мутантный штамм *Msm* с делецией гена *MSMEG_4279* (ΔАЦ - мутантный штамм) (см. Материал и методы). Мутант ΔАЦ был способен образовывать «некультивируемые» клетки в условиях недостатка калия, но их не удалось реактивировать в присутствии ЖК, что оценивалось по скорости роста или активации метаболизма (включение урацила) (Рис. 80а, б). У мутанта ΔАЦ внутриклеточные уровни цАМФ оставались очень низкими как с (в отличие от дикого типа), так и без (аналогично дикому типу) добавления олеиновой кислоты (Рис. 78). Однако «некультивируемые» клетки мутанта ΔАЦ были способны к реактивации в ответ на экзогенное добавление цАМФ (3 мМ) (Рис. 80а), хотя с более медленной скоростью, чем в случае дикого типа (видимый

рост для мутанта наблюдался после 11 дней инкубации по сравнению с 5 днями для дикого типа).

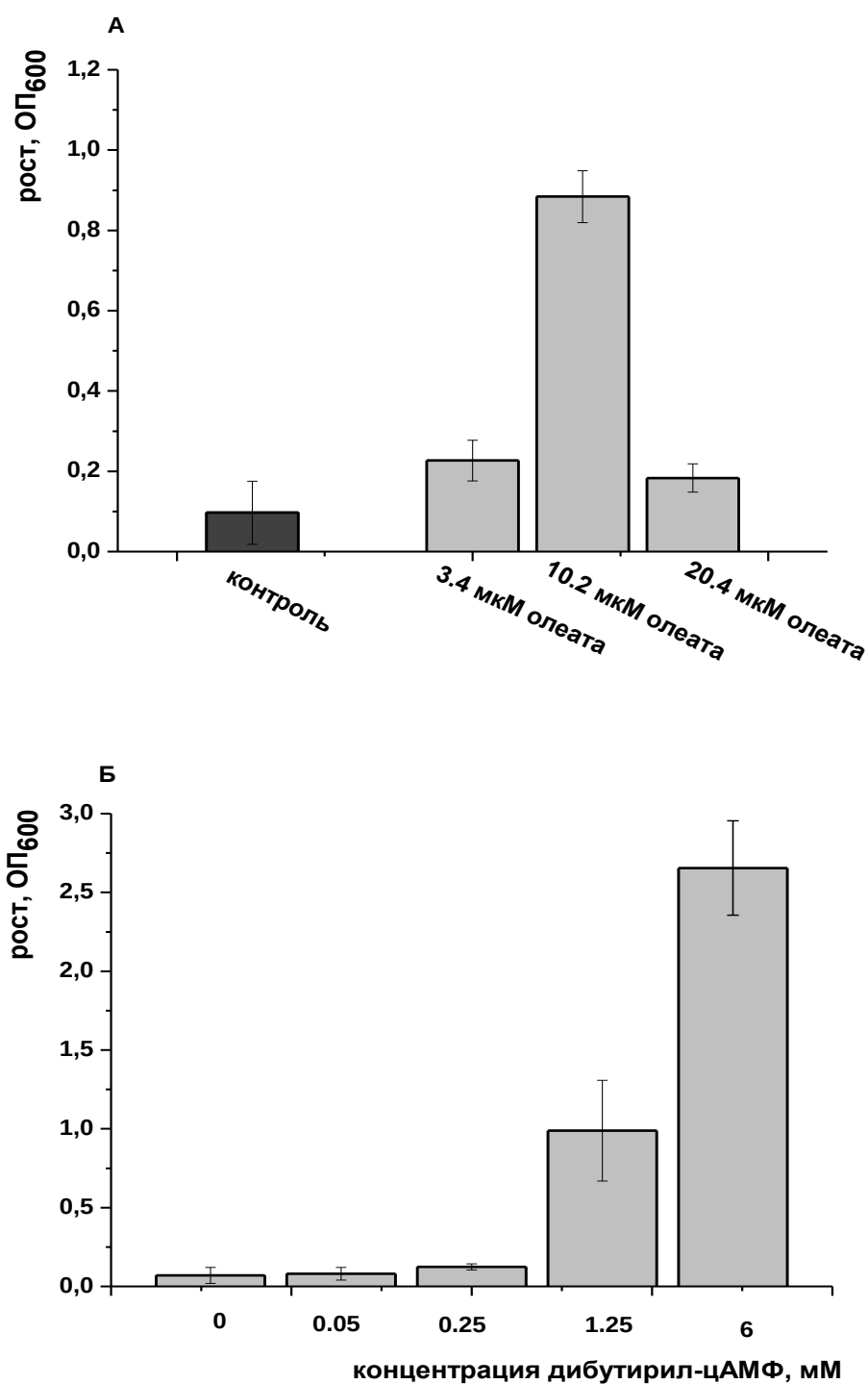


Рис. 79. Индуцированная жирными кислотами (А) и дибутирил-цАМФ (Б) реактивация «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*. ПМ были инокулированы до исходного OD₆₀₀ = 0,2 и реактивированы в колбах. OD 600 измеряли после реактивации в течение 20 дней (А) или 25 дней (Б). Бары представляют стандартное отклонение.

Дефект реактивации мутанта $\Delta A\text{Ц}$ был исправлен введением плазмиды, содержащей ген *MSMEG_4279*. «Некультивируемые» формы такого комплементированного $\Delta A\text{Ц}$ штамма ($\Delta A\text{Ц} + \text{pMind-A}\text{Ц}$), были способны к реактивации даже в отсутствие ЖК (Рис. 80а). Интересно, что штамм *Msm* дикого типа, гиперэкспрессирующий аденилатциклазу *MSMEG_4279* (*pMind-A}\text{Ц}), не был способен образовывать «некультивируемые» формы в условиях, идентичных для штаммов дикого типа и $\Delta A\text{Ц}$ (Рис. 81). Это коррелировало со значительным увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ в штамме с гиперэкспрессией АЦ (*pMind-A}\text{Ц}*) по сравнению с контролем (*pMind*) во время перехода клеток в «некультивируемое» состояние в постстационарной фазе (Рис. 81).*

Таким образом, аденилатциклаза *Msm*, кодируемая геном *MSMEG_4279*, является потенциальным кандидатом для того, чтобы вызывать повышенный внутриклеточный уровень цАМФ, наблюдаемый после добавления ЖК к «некультивируемым» клеткам *Msm* (Рис. 77).

Повышенное содержание внутриклеточного цАМФ регистрировалось при сравнении эффектов АДС и ОАДС (олеиновая кислота, альбумин, декстроза, каталаза) на уровне цАМФ в *M. bovis* (Bai et al., 2009). Имеется две линии доказательств, подтверждающих участие АЦ, кодируемой *MSMEG_4279*, в наблюдаемой реактивации «некультивируемых» микобактерий под действием ЖК. Во-первых, ЖК можно заменить цАМФ в экспериментах по реактивации, а во-вторых, мутант с делецией *MSMEG_4279* ($\Delta A\text{Ц}$) не был способен к реактивации в присутствии ЖК, но реактивировался в присутствии цАМФ. Гиперэкспрессия гена *MSMEG_4279* в клетках *Msm* дикого типа предотвращала переход активных бактерий в покоящееся «некультивируемое» состояние, вероятно, из-за присутствия неестественно высоких уровней внутриклеточного цАМФ (Рис. 81).

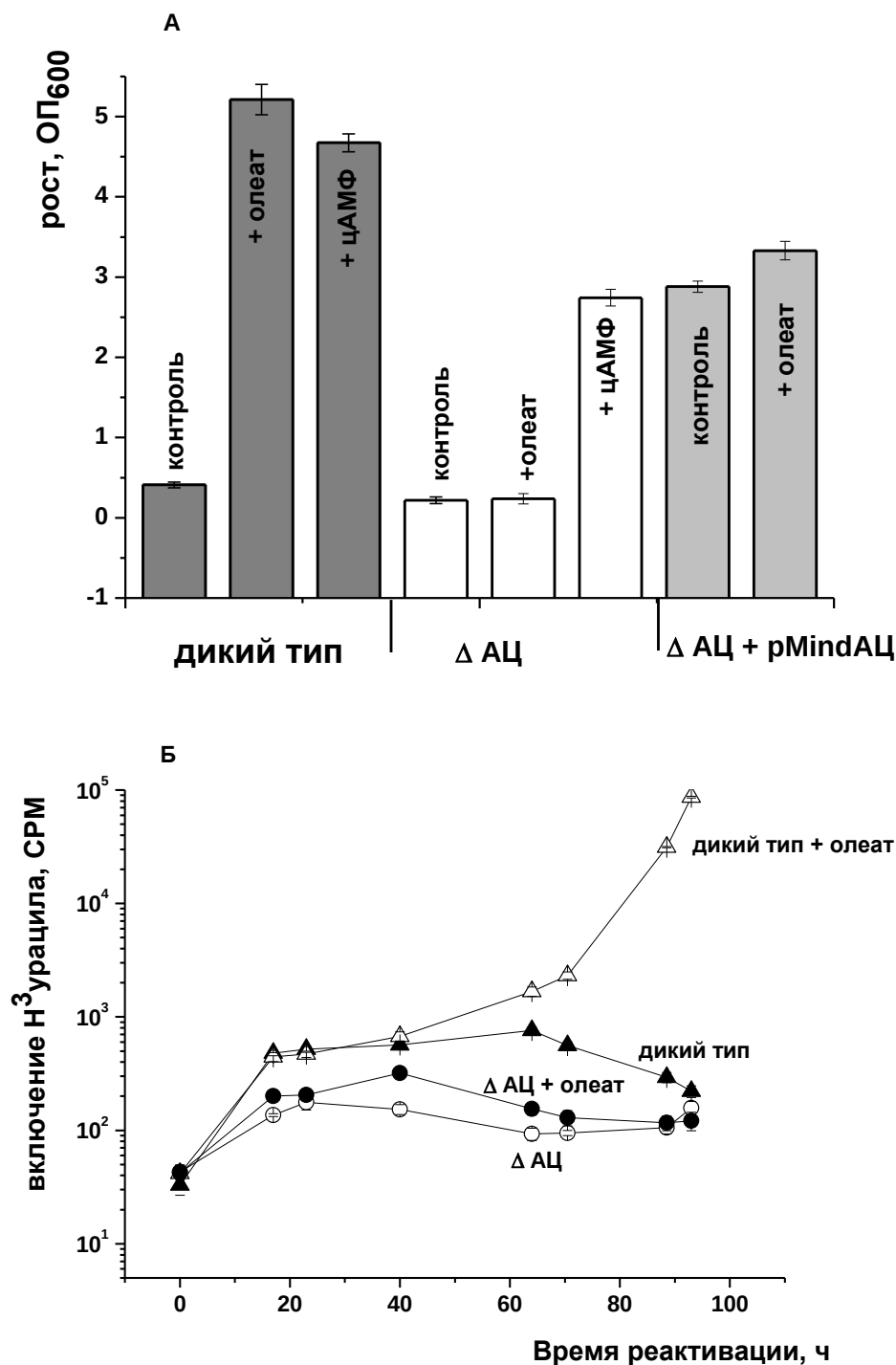


Рис. 80. Участие аденилатциклазы, кодируемой геном *MSMEG_4279*, в индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» микобактерий. «Некультивируемые» микобактерии были получены в условиях недостатка калия и реактивированы в жидкой среде. А - OD₆₀₀ измеряли после реактивации в течение 5 дней для штаммов *Msm* дикого типа, мутанта с делецией АЦ с восстановленным геном АЦ (pMindAc) и через 11 дней для мутантного штамма с делецией АЦ (ΔAC). Олеиновая кислота и цАМФ были добавлены в концентрациях 3,5 мМ и 3 мМ, соответственно. Б - пробы периодически отбирали в течение первых четырех дней из культур дикого типа и мутанта ΔAC (реактивированных как с, так и без олеиновой кислоты) для оценки клеточной метаболической активности (включение урацила).

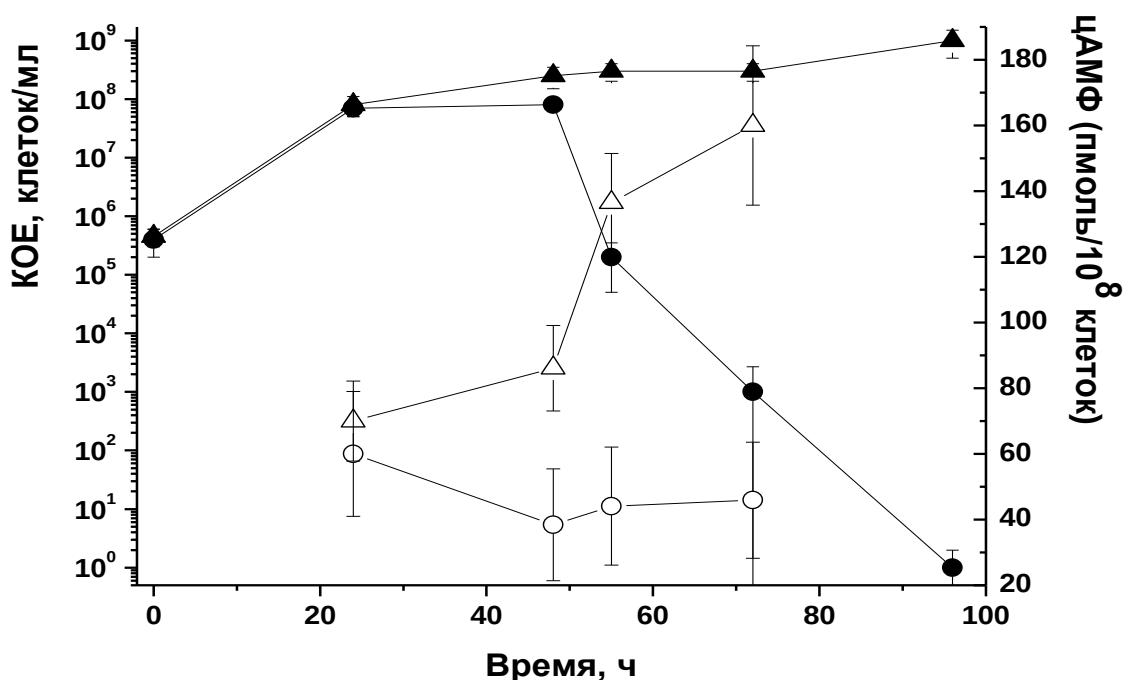


Рис. 81. Гиперэкспрессия аденилатциклазы MSMEG_4279 предотвращает переход клеток *M. smegmatis* в «некультивируемое» состояние. Клетки *M. smegmatis* инокулировали в модифицированную (без ионов калия) среду Хартмана-де-Бонта (mHdB) и инкубировали при сильной аэрации 200 об/мин) при 37°C. Штаммы, содержащие pMind (пустой плазмидный вектор) или pMindАЦ (аденилатциклазная гиперэкспрессионная плазмида), обозначены кружками и треугольниками, соответственно. Образцы периодически отбирали для определения КОЕ (закрытые символы) и внутриклеточного содержания цАМФ (открытые символы). Этот эксперимент был повторен три раза с аналогичными результатами; бары представляют стандартное отклонение.

Комплементированные клетки мутанта *Msm* с делецией аденилатциклазы (Δ АЦ+pMind-АЦ) с неконтролируемой экспрессией MSMEG_4279, проявляли свойства, промежуточные между свойствами дикого типа и штамма Δ АЦ: такие клетки были способны образовывать «некультивируемые» формы, но они были способны к реактивации без какого-либо внешнего стимула (Рис. 80а). Интересно, что стимулирующее действие ЖК на Rv2212 у *Mtb* наблюдается только при низких внутриклеточных концентрациях АТФ (Motaal et al., 2006), сходных с теми, которые обнаруживаются в покоящихся клетках *Msm* (Таблица 5). Действительно, добавление ЖК к активно растущим клеткам *Msm* в концентрациях, используемых для реактивации, не стимулировало рост бактерий. Аналогично *Msm*, олеиновая кислота и дибутирил-цАМФ вызывают реактивацию покоящихся клеток *Mtb* (Рис. 79а,

б). Это позволяет предположить, что механизм ЖК-зависимой реактивации покоящихся форм *Mtb* может быть аналогичен *Msm*.

Плейотропные эффекты цАМФ, который выступает в качестве вторичного мессенджера в разнообразных бактериальных процессах, хорошо известны (Baker and Kelly, 2004). Участие цАМФ и АЦ в выходе из конститутивного покоя (прорастание спор) также установлено (Süsstrunk et al., 1998). Содержание цАМФ в спорах стрептомицетов очень низкое. Однако уровень цАМФ существенно увеличивается во время прорастания спор, а затем снова снижается во время поздней фазы роста мицелия (Süsstrunk et al., 1998). Мутант *Str. coelicolor* с делецией АЦ был дефектен в отношении прорастания спор, и этот фенотип был подавлен добавлением цАМФ в концентрации выше 1 мМ (Süsstrunk et al., 1998). В более поздней работе был описан рецептор для цАМФ в *Str. coelicolor*, который оказался гомологичен белку Crp в *E. coli*. Мутанты с делецией *Crp*, проявляли сходные дефекты при прорастании спор и другие физиологические эффекты, которые наблюдались у мутантов с делецией гена АЦ. Эти результаты привели к заключению, что система цАМФ-АЦ- Crp играет важную роль в контроле прорастания спор у *Str. coelicolor* (Derouaux et al., 2004). В отличие от *Streptomyces*, споры амебы *Dictyostelium discoideum* содержат в 10 раз больше цАМФ, чем активно размножающиеся клетки. Высокий уровень цАМФ снижался только после прорастания спор. Однако, несмотря на высокий уровень цАМФ в начале прорастания спор, его внутриклеточная концентрация временно возрастала в фазе раннего прорастания, что аналогично тому, что происходит во время прорастания спор *Streptomyces* (Virdy et al., 1999). Последующие процессы, которые связывают повышенные 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 могут регулировать ряд биологически важных путей, включая дыхание и метаболизм жирных кислот и углеводов (Bai et al., 2011). Bai и соавторы выявили предполагаемый регулон CRPmt, который включает более

100 генов, значительное число которых также участвует в контроле покоя у *Mtb* (Bai et al., 2005). В контексте данного исследования важно, что CRPmt (Rv3676) активирует экспрессию одного из пяти генов *rpf* (*rpfA*), обнаруженных у *Mtb* (Rickman et al., 2005).

3.3.4. Гиперэкспрессия аденилатциклазы Rv2212 и цАМФ-зависимого транскрипционного фактора Rv3676 в *M. tuberculosis* улучшает жизнеспособность бактерий, ускоряет реактивацию из покоящегося состояния и повышает вирулентность у мышей.

В *Mtb* гомологом 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 плеiotропное действие на клеточный метаболизм. В частности, цАМФ-зависимый фактор транскрипции Rv3676 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 и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (цАМФ-ТФ) Rv3676, способствуют сохранению активного метаболического состояния *Mtb* в стрессовых условиях, а также стимулирует реактивацию покоящихся бактерий из-за увеличения продукции внутриклеточного цАМФ. Чтобы изучить влияние АЦ и цАМФ-ТФ на рост и реактивацию *Mtb*, мы сконструировали штаммы (pMindRv2212 и pMindRv3676) с гиперэкспрессией АЦ и цАМФ-ТФ CRP под контролем промотора тетрациклина (Тс) и продемонстрировали, что штамм pMindRv2212 обладает статистически значимым увеличением внутриклеточного уровня цАМФ в экспоненциальной фазе по сравнению с контрольным штаммом, содержащим «пустой» вектор pMind. Неиндуцированный штамм pMindRv2212 показал повышенный уровень экспрессии цАМФ, сравнимый с уровнем индуцированного штамма (Рис. 82). Очевидно, что уровень фоновой

экспрессии под Tc-промотором в *Mtb*, когда индуктор отсутствует, является достаточным, что полностью согласуется с нашими результатами в *M. smegmatis* для гиперэкспрессированного MSMEG_4279 (гомолог Rv2212).

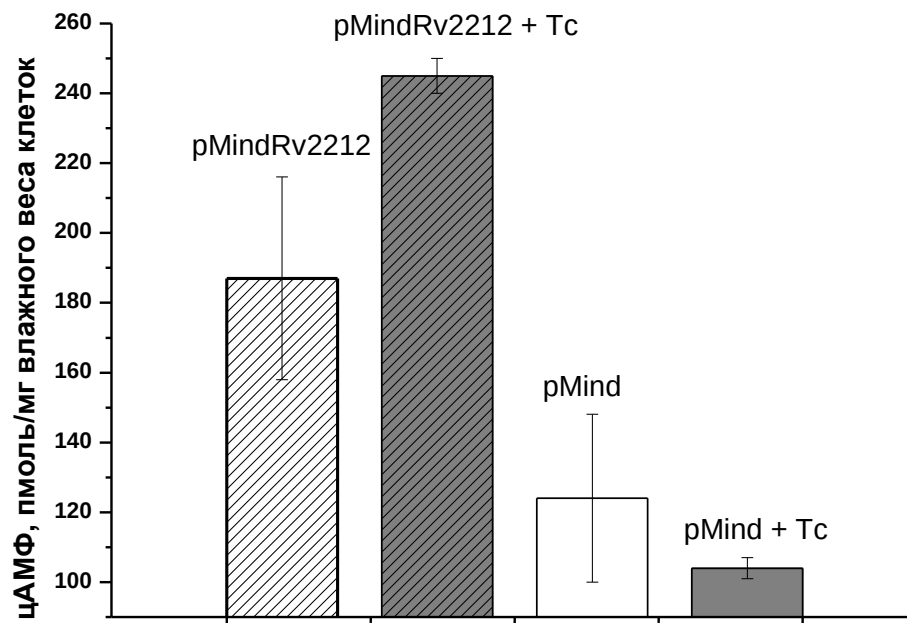


Рис. 82. Уровни цАМФ в разных штаммах *M. tuberculosis*, выращенных на среде Сотона в течение 8 дней.

Мы сравнили рост новых штаммов в жидкой среде Сотона. Как показано на рисунке 83, бактерии с гиперэкспрессией АЦ или CRP росли быстрее по сравнению с контрольным штаммом. Примечательно, что сильная разница в скоростях роста между двумя штаммами была легко выявлена, если исходный инокулят содержал небольшое количество бактерий (10^2 на мл), что обеспечивает условия, которые являются более неблагоприятными для начала роста по сравнению с более крупными исходными популяциями (Mukamolova et al., 2002a). Если для инициации роста использовали инокулят большего размера (на 3 log), то скорость размножения оказалась почти одинаковой. Мы также заметили, что бактерии штамма pMindRv2212 быстро восстанавливаются из старого инокулята и из высушенных образцов в отличие от клеток pMind штамма.

Затем мы изучили, влияет ли избыточная экспрессия генов *Rv2212* или *Rv3676* на переход активно растущих бактерий в состояние покоя. Мы применили разработанную нами модель, позволяющую накапливать покоящиеся овоидные клетки при постепенном закислении среды роста в течение продолжительной стационарной фазы. Такие покоящиеся бактерии, обладающие измененной морфологией и характеризующиеся «некультурностью», то есть временной потерей способности расти на плотной среде, могут формироваться в модифицированной среде Сотона, содержащей глицерин или глюкозу в качестве основного источника углерода. Как показано на Рис. 84а, в среде на основе глицерина формирование «некультивируемых» бактерий штаммов pMindRv2212 или pMindRv3676 наблюдалось значительно позже по сравнению с бактериями контрольного штамма pMind.

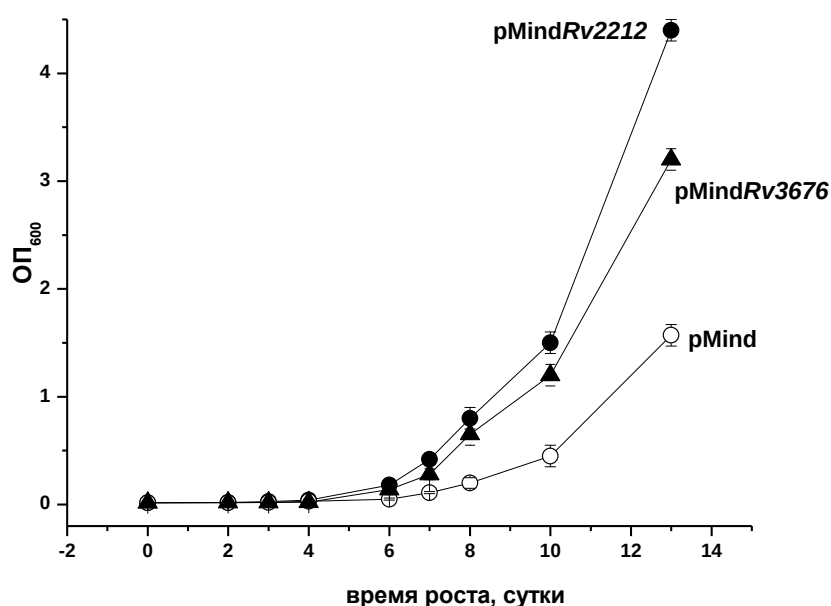


Рис. 83. Рост штаммов *M. tuberculosis* в стандартной среде Сотона. Рекомбинантные штаммы *Mtb*, содержащие вектор pMindRv2212 (закрашенные кружки), вектор pMindRv3676 (закрашенные треугольники) или пустой вектор pMind (незакрашенные кружки), культивировали в стандартной среде Сотона с перемешиванием (200 об/мин) при 37°C. Первоначальный размер инокулята составлял 10^2 клетки на мл. Этот эксперимент был повторен 3 раза с аналогичными результатами. Один типичный эксперимент показан.

При росте в среде на основе глюкозы бактерии штамма pMindRv2212 сохраняли постоянное количество КОЕ на плотной среде в течение всего периода наблюдения, тогда как контрольный штамм постепенно приобретал

«некультивируемый» фенотип, хотя намного медленнее, чем в среде на основе глицерина (Рис. 84б).

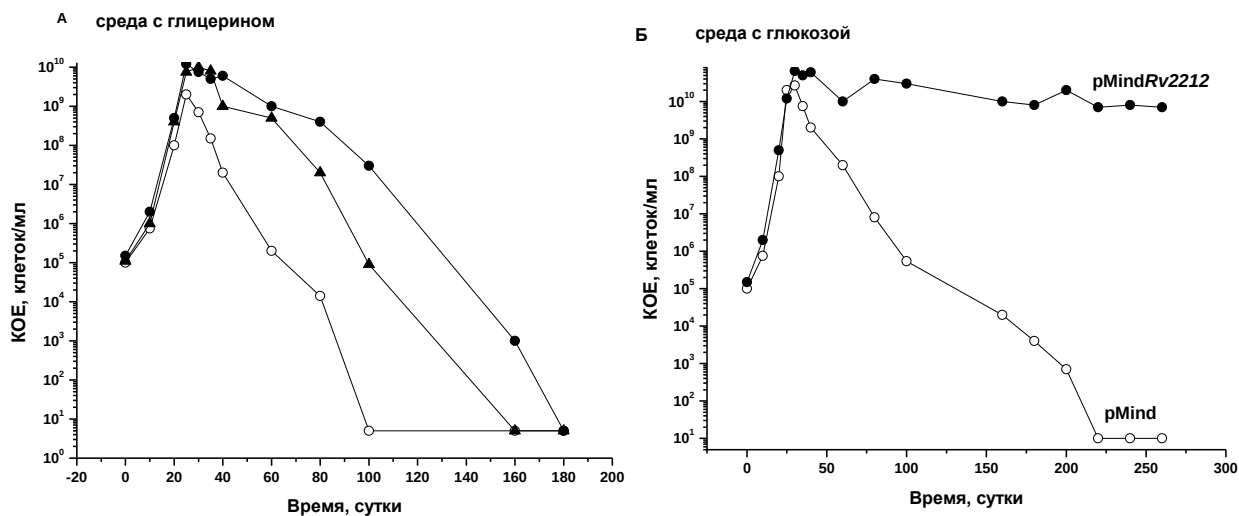


Рис. 84. Гиперэкспрессия *Rv2212* или *Rv3676* влияет на переход *M. tuberculosis* в покоящееся «некультивируемое» состояние. Рекомбинантные штаммы *M. tuberculosis*, содержащие вектор pMindRv2212 (закрашенные кружки), вектор pMindRv3676 (закрашенные треугольники) или пустой вектор pMind (незакрашенные кружки), выращивали в модифицированной среде Сотона, содержащей глицерин (А) или глюкозу (Б) с перемешиванием (200 об/мин) при 37°C. Минимальный порог для определения КОЕ составлял 10 клеток на мл. SEM определение КОЕ составляло <20%. Эксперименты, показанные в 87А и 87Б, были повторены два раза и четыре раза соответственно. Типичные результаты показаны.

Разница между двумя средами может быть вызвана либо более быстрым подкислением среды на основе глицерина во время роста штамма pMind, либо отсутствием подкисления среды на основе глюкозы во время роста штамма pMindRv2212.

«Некультивируемые» микобактерии способны к реактивации в результате культивирования в подходящей жидкой среде. «Некультивируемые» бактерии штаммов pMindRv2212 и pMindRv3676, полученные на среде с глицерином, демонстрируют значительно более короткую лаг-фазу и более быструю реактивацию по сравнению с контрольным штаммом pMind (Рис. 85).

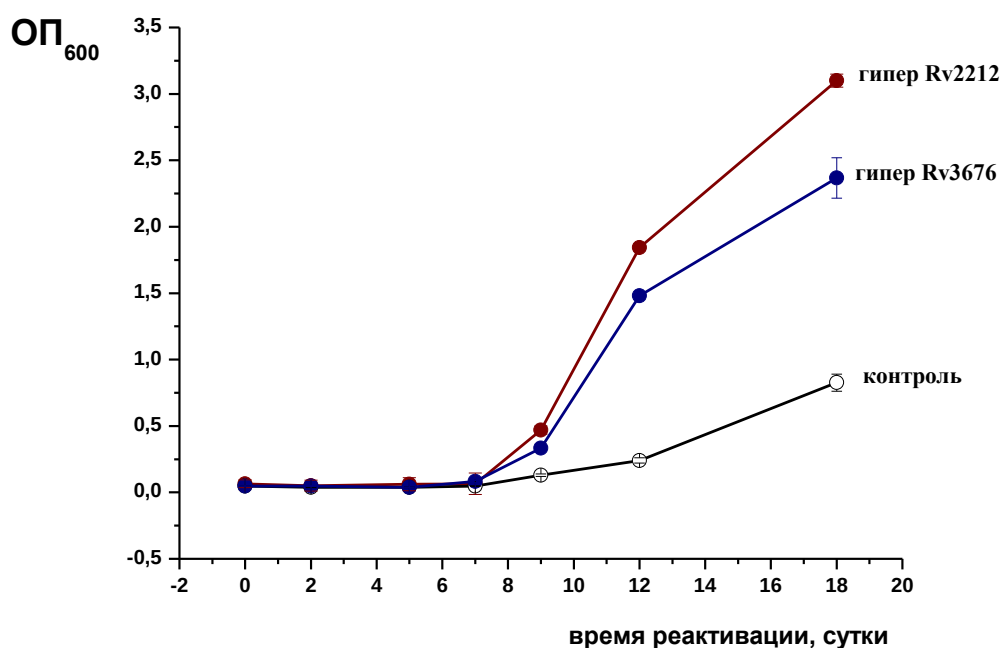


Рис. 85. Гиперэкспрессия Rv2212 или Rv3676 приводит к более быстрой реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Некультивируемые формы *Mtb* штаммов pMindRv2212 (закрашенные кружки), pMindRv3676 (закрашенные треугольники) или pMind (незакрашенные кружки), полученные на содержащей глицерин модифицированной среде Сотона после 180-дневной инкубации, промывали, инокулировали в среду реактивации и инкубировали при перемешивании (100 об/мин) при 37°C. Эксперимент был повторен два раза с аналогичными результатами.

Чтобы изучить влияние избыточной экспрессии Rv2212 и Rv3676 на характеристики реальной туберкулезной инфекции, мышей двух инбредных штаммов, генетически устойчивых к ТБ (линия B6) и гиперчувствительных к ТБ (I/St) (Nikonenko et al., 2000), инфицировали бактериями штаммов pMindRv2212, pMindRv3676 и pMind. Обычно при отсутствии специфической селекции микобактерии выбрасывают любую вставленную плазмиду, если кодирующий ген не обеспечивает селекционного преимущества. Чтобы оценить стабильность присутствия плазмиды, на 3 неделе заражения гомогенаты легких инфицированных животных высевали на плотную среду и присутствие плазмиды оценивали в полученных бактериальных колониях в формате ПЦР. Даже в отсутствие селекции под действием гигромицина все анализируемые колонии содержали плазмиду с интактными вставками генов Rv2212 или Rv3676, что явно свидетельствует о том, что избыточная экспрессия АЦ или CRP полезна для размножения бактерий в хозяине. Этот вывод был дополнительно подтвержден наблюдением, что при посевах из

органов колонии штаммов с гиперэкспрессией изучаемых генов были заметно увеличены по сравнению с колониями контрольного штамма, развивающимися в идентичных условиях (Рис. 86а). На ранней стадии инфекции (3 недели) количество КОЕ в легких у генетически восприимчивых мышей I/St было значительно ниже для штамма pMind по сравнению с pMindRv2212 и pMindRv3676, тогда как генетически более устойчивые мыши B6 контролировали инфекцию, вызванную этими микобактериальными штаммами одинаково хорошо (Рис. 86б). Через 6 месяцев после заражения даже мыши B6 были неспособны контролировать рост штамма pMindRv2212 в легких, чего не было в случае штамма pMind. Количество КОЕ в легких увеличилось приблизительно на 1 log по сравнению с трехнедельными подсчетами для штамма pMindRv2212, и существенные различия также были очевидны в селезенке (Рис. 86в). Важно отметить, что в этом эксперименте количество КОЕ было идентичным для гигромицин-содержащих и не содержащих антибиотиков агаризованных сред, подтверждая, что плаزمида удерживалась бактериями в течение длительного хронического инфекционного процесса (данные не показаны). В соответствии с результатами оценки микобактериального КОЕ, кривые смертности, полученные на мышах B6, продемонстрировали, что штамм pMindRv2212 был гораздо более вирулентным по сравнению с контрольным штаммом (Рис. 87). В этом исследовании мы представляем несколько линий доказательств, указывающих на важность экспрессии АЦ или CRP и продукции цАМФ для повышения жизнестойкости *Mtb*, растущего в неблагоприятных условиях. Во-первых, наблюдалась значительная разница в динамике роста *in vitro* между штаммами pMindRv2212 или pMindRv3676 и контрольным штаммом, если развитие бактериальной популяции начиналось с небольшого количества инокулята (Рис. 83).

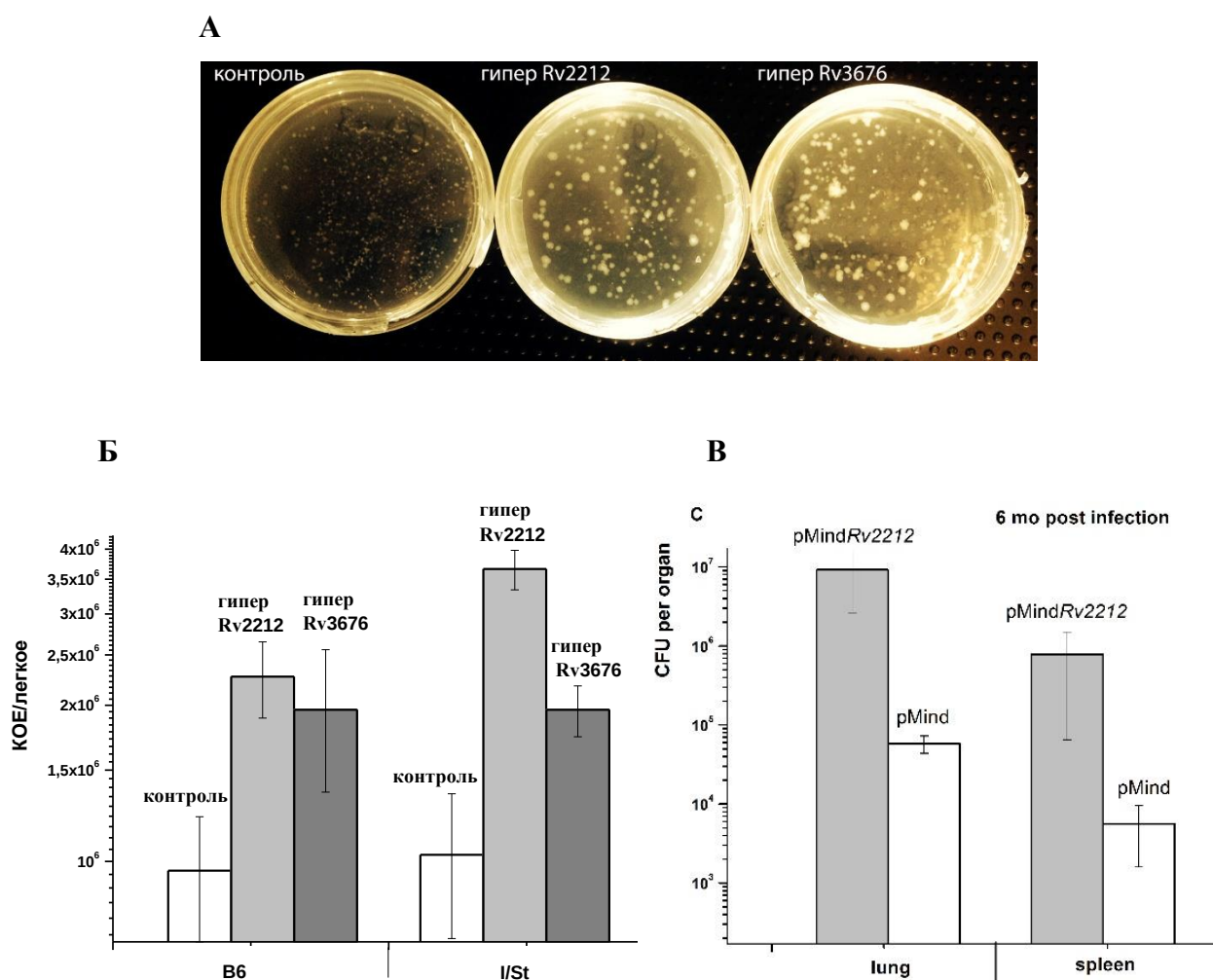


Рис. 86. Фенотип штаммов *M. tuberculosis* pMindRv2212, pMindRv3676 и контрольного pMind, проявляемый *in vivo*. (А) Штаммы pMindRv2212 и pMindRv3676, выделенные из легких, давали более крупные колонии по сравнению с контрольным штаммом. Легкие инфицированных мышей B6 гомогенизировали, высевали на агаризованную среду Дюбо, инкубировали при 37 ° C в течение 3 недель и фотографировали. (Б) Мышей инбредных штаммов I/St и B6 инфицировали 5×10^6 КОЕ штаммов pMindRv2212, pMindRv3676 или pMind. На 3-й неделе после заражения легкие были гомогенизированы и серийные разведения высеваны на плотную среду Дюбо. Результаты двух экспериментов, включающих 4 мышей в каждом (общее N = 8), выражены как среднее $\pm$ SEM. Значительная разница ($P < 0,01$, ANOVA) наблюдалась между pMindRv2212-инфицированными мышами B6 и I/St. (В) Через 6 месяцев после заражения наблюдали ~ 2 log различия ($P < 0,001$, ANOVA) между размножением микобактерий pMindRv2212 и pMind в легких и селезенке мышей B6. Результаты выражены как среднее $\pm$ SEM для групп по 4 мыши в каждой.

Такие культуры с «низким инокулятом» трудно выращивать (Drancourt and Raoult, 2007; Mukamolova et al., 2002c), и чаще всего требуется добавление внешних факторов роста для инициации их активной репликации (Mukamolova et al., 2002a). Напротив, если для инициации роста микобактериальной жидкой культуры используется больший размер

инокулята, избыточная экспрессия генов Rv2212 и Rv3676 не влияет на динамику роста. Как было показано ранее, *M. bovis* BCG с избыточной экспрессией Rv2212 не проявил значительных различий в росте *in vitro* по сравнению с бактериями дикого типа, однако в этом исследовании были использованы только высокие исходные концентрации инокулята.

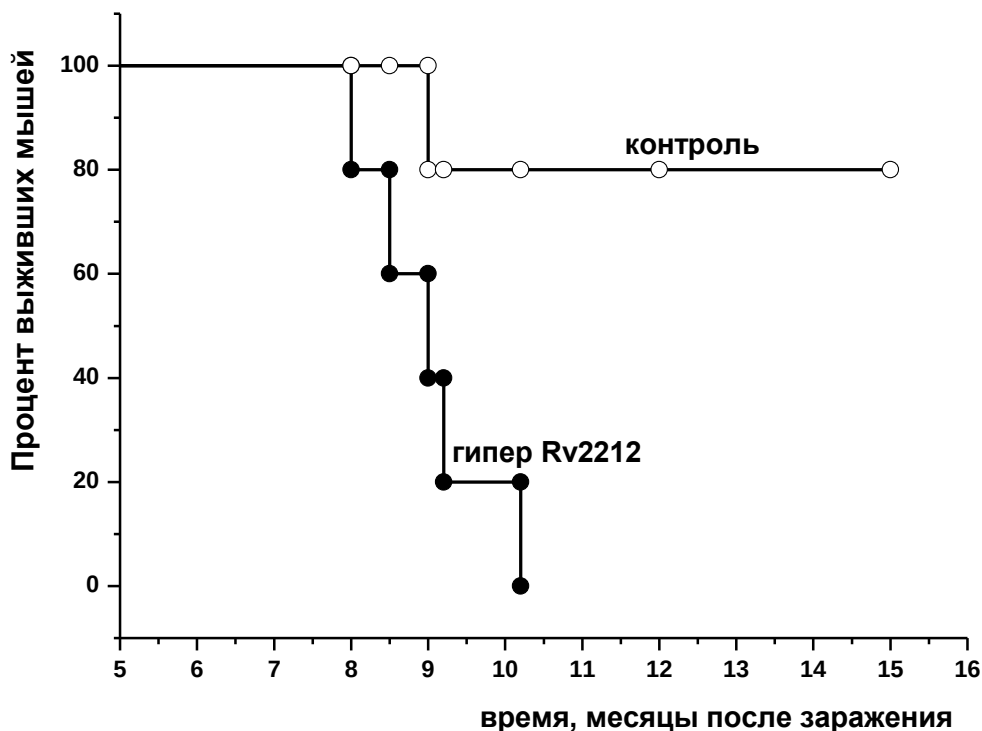


Рис. 87. Вирулентность мутантных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* pMindRv2212 и pMind *in vivo*. Мышей инбредного штамма В6 инфицировали 5×10^6 КОЕ штаммов pMindRv2212 (закрашенные кружки) или pMind (незакрашенные кружки). Смертность мышей проверяли еженедельно.

Штамм *M. bovis* с гиперэкспрессией Rv2212 демонстрировал значительное ускорение роста по сравнению с контрольным штаммом в макрофагах мышей, то есть когда очевидны стрессовые условия для внутриклеточного паразита (Pedroza-Roldán et al., 2015). Подобно этому, гиперэкспрессия Rv2212 в клетках *Msm* приводила к повышенной выживаемости бактерий в макрофагах (Ganaie et al., 2016). Во-вторых, важность продукции цАМФ была подтверждена в экспериментах по развитию «некультивируемости» покоящихся бактерий *in vitro* в условиях закисления среды (Рис. 25). Гиперэкспрессия АЦ приводила к длительному поддержанию бактериальной способности образовывать КОЕ и к существенной задержке или даже

предотвращению бактериального перехода в состояние покоя (Рис. 84). В-третьих, повышенная экспрессия Rv2212/ Rv3676 и выработка цАМФ существенно стимулировали восстановление *Mtb* из «некультивируемого» покоящегося состояния и промотировали рост микобактерий (Рис. 85). Наконец, эксперименты *in vivo* продемонстрировали, что повышенный уровень экспрессии АЦ или цАМФ-ТФ (и, очевидно, продукции цАМФ) стимулировал размножение *Mtb* в органах мышей. На основании данных *in vivo* мы можем предположить, что нерегулируемая продукция цАМФ приводит к предотвращению перехода бактерий в состояние покоя *in vivo* и предотвращает развитие латентной фазы заболевания. В то же время развитие покоя и латентности может быть определено внутриклеточным уровнем цАМФ, как мы обнаружили в наших экспериментах *in vitro* (Рис. 25). Штаммы с гиперэкспрессией Rv2212 или Rv3676 демонстрировали повышенную вирулентность как у генетически чувствительных к ТБ мышей, так и у устойчивых к ТБ мышей по сравнению с контрольным штаммом (Рис. 86б). Это важное наблюдение, демонстрирующее, что либо сама микобактериальная АЦ, либо биохимический каскад, вызываемый ее активностью, может оказаться мишенью для новых противотуберкулезных препаратов. Это противоречит результатам, полученным для штамма BCG-Rv2212, который продемонстрировал не отличался от контрольного штамма в организме мыши (Pedroza-Roldán et al., 2015). Это различие может быть связано с различным расположением *Mtb* и *M. bovis* BCG в организме хозяина. Было установлено, что высоковирулентные штаммы микобактерий, например *M. tuberculosis* и *M. leprae*, легко мигрируют из фагосом в цитозоль миелоидных клеток и продолжают свою репликацию в этом новом клеточном компартменте (van der Wel et al., 2007). Эта миграция в значительной степени зависит от белка ESAT-6, который нарушает сигнальный путь TLR2-MyD88 в клетках-хозяевах, что важно для предотвращения миграции микобактерий из фагосом (Rahman et al., 2014). В геномах подавляющего большинства невирулентных или низковирулентных микобактерий, включая БЦЖ,

секреторная система RD1, содержащая гены основных факторов вирулентности ESAT-6 и cfp10, отсутствует (Van Ingen et al., 2009), и очень большая часть общей бактериальной популяции действительно находится в фагосомах макрофагов. Различия во внутриклеточных концентрациях цАМФ могут по-разному влиять на выживаемость микобактерий, находящихся в компартментах фагосом и цитозолей. Существует достаточно доказательств важной роли производства цАМФ для выживания патогена в клетках-хозяевах. Так, высокие количества цАМФ, секретируемые *Mtb* в макрофагах, модулируют слияние фагосома-лизосома, увеличивая выживаемость микобактерий (Kalamidas et al., 2006). Положительное влияние на выживаемость микобактерий может оказывать эффект «интоксикации» макрофагов высокими концентрациями цАМФ (Agarwal et al., 2009). цАМФ влияет на экспрессию генов, участвующих в микобактериальном ответе на условия гипоксии, часто присутствующие *in vivo* (Gazdik and McDonough, 2005). Высокие концентрации цАМФ увеличивают устойчивость микобактерий к стрессовым условиям за счет повышения экспрессии шоковых белков GroEL и DnaK (Pedroza-Roldán et al., 2015). Кроме того, цАМФ непосредственно регулирует активность таких ферментов, как малатдегидрогеназа (Gazdik and McDonough, 2005) и лизинацетилаза (Rv0998) (Knapp and McDonough, 2014b), участвующих в центральных микобактериальных метаболических путях (Xu et al., 2011). Эти разнообразные эффекты вполне могут объяснить лучшую выживаемость *in vivo* штамма с гиперэкспрессией Rv2212.

Следует отметить, что молекулярные механизмы повышения микобактериальной приспособленности при повышенных концентрациях цАМФ остаются неясными. Значение внутриклеточного цАМФ в качестве второго мессенджера для широкого спектра бактериальных биохимических процессов хорошо установлено (Baker and Kelly, 2004), но конкретные процессы, связывающие уровни цАМФ и жизнеспособность бактерий на уровне транскрипции, не определены четко. Были описаны два

транскрипционных фактора, чувствительных к цАМФ внутри клетки: CRPMt (Rv3676) и Cmr (Rv1675c) (Knapp and McDonough, 2014b). Было продемонстрировано, что Cmr имеет более 300 сайтов связывания с бактериальной хромосомой и, таким образом, потенциально может участвовать в регуляции широкого спектра метаболических процессов. В контексте настоящей работы стоит упомянуть, что цАМФ модулирует связывание Cmr с генами, принадлежащими к регулону DosR, что важно для выживания *Mtb* в условиях гипоксии в нерепликативном состоянии (Ranganathan et al., 2016). CRPMt также демонстрирует плеотропные эффекты, включая контроль биосинтеза аминокислот (Bai et al., 2011), экспрессию гена RpfA, кодирующего фактор, стимулирующий микобактериальную реактивацию (Mukamolova et al., 2003) и экспрессию сукцинатдегидрогеназы (Rv0247c-Rv0249c) (Knapp et al., 2015).

На основании полученных результатов мы предполагаем, что повышенная концентрация продукции цАМФ из-за активации АЦ Rv2212 увеличивает продукцию RpfA через цАМФ-ТФ Rv3676. Как правило, эти реакции играют «антипокоящуюся» роль, поддерживая активное состояние *Mtb* в неблагоприятных условиях в культуре и размножение внутри хозяина.

3.3.5. Связь жирных кислот, цАМФ и белков Rpf в реактивации покоящихся микобактерий.

Известно, что белки семейства Rpf участвуют в реактивации покоящихся «некультивируемых» микобактерий и являются пептидогликангидролазами (Kana and Mizrahi, 2010), и поэтому было важно определить, связаны ли каким-либо образом ЖК-цАМФ- и Rpf-зависимая реактивация. Чтобы ответить на этот вопрос, мы провели эксперименты по ЖК-индуцируемой реактивации в присутствии предполагаемых ингибиторов Rpf нитрофенилтиоцианатов (НФТ).

3.3.5.1. Нитрофенилтиоцианаты ингибируют ферментативную и биологическую активность белков Rpf.

Низкомолекулярные вещества (нитрофенилтиоцианаты) были синтезированы в лаборатории В. А. Макарова и предоставлены нам для оценки их ингибирующего действия в отношении ферментативной и биологической активности белков Rpf.

Низкомолекулярные компоненты семейства нитрофенилтиоцианатов (НФТ) сильно подавляли прорастание грибковых спор (неопубликованные результаты) и, следовательно, были рассмотрены как перспективные ингибиторы гидролаз клеточной стенки, включая литические трансгликозилазы, класс ферментов, структурно сходных с Rpf, которые участвуют в прорастании эндоспор (Atrih and Foster, 1999) и хитиназы, участвующей в прорастании спор грибов (Qazi and Khachatourians, 2008).

Было исследовано влияние соединений на муралитическую активность Rpf на основе гидролиза искусственного флуорогенного субстрата, 4-MUF-3-NAG, ранее примененного для анализа активности рекомбинантного Rpf *M. luteus* (Mukamolova et al., 2006). Белки Rpf обычно очень нестабильны и быстро инактивируются после выделения (Mukamolova et al., 2006). Для решения этой проблемы мы использовали два разных рекомбинантных белка Rpf, которые обладают довольно высокой стабильностью, растворимостью и сохраняют активность в течение более длительного периода времени. Во-первых, была взята укороченная форма Rpf *M. luteus*, в которой отсутствуют последние 89 аминокислотных остатков С-концевой части (Rpf Sm), и, во-вторых, ранее описанная укороченная форма Rpf В (Δ_{DUF} RpfB) (Ruggiero et al., 2009). Оба белка были способны гидролизовать 4-MUF-3-NAG с максимальной удельной активностью при $7,6 \pm 3,3$ нмоль/мг·ч и $2,5 \pm 1,4$ нмоль/мг·ч для RpfSm и Δ_{DUF} RpfB соответственно. Мы обнаружили, что четыре из пяти первоначально протестированных соединений (I) - (IV) и (IX) ингибировали муралитическую активность обоих белков в диапазоне концентраций 1–7 мг/мл (Таблица 13).

Таблица 13. Влияние соединений НФТ на рост *M. luteus* и на муралитическую активность белков Rpf.

№ вещества	Химическое название	МИК для <i>M.luteus</i> , мкг/мл	Константа ингибирования (K_{i50}) гидролиза 4-MUF-3-NAG, мкг/мл	
			Rpf Sm	Δ_{DUF} Rpf B
I	4-метокси-5-нитро-6-тиоцианатопиримидин	НИ	5.3±1.7	НО
II	4-изопропиламино-5-нитро-6-тиоцианатопиримидин	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-тиоцианобензонитрил	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	Метилловый эфир 3-нитро-4-тиоцианатобензойной к-ты	5–10	5.6±1.5	0.5±0.1
X	Этиловый эфир 3-нитро-4-тиоцианато-бензойной к-ты	10	2.6±1.1	НО

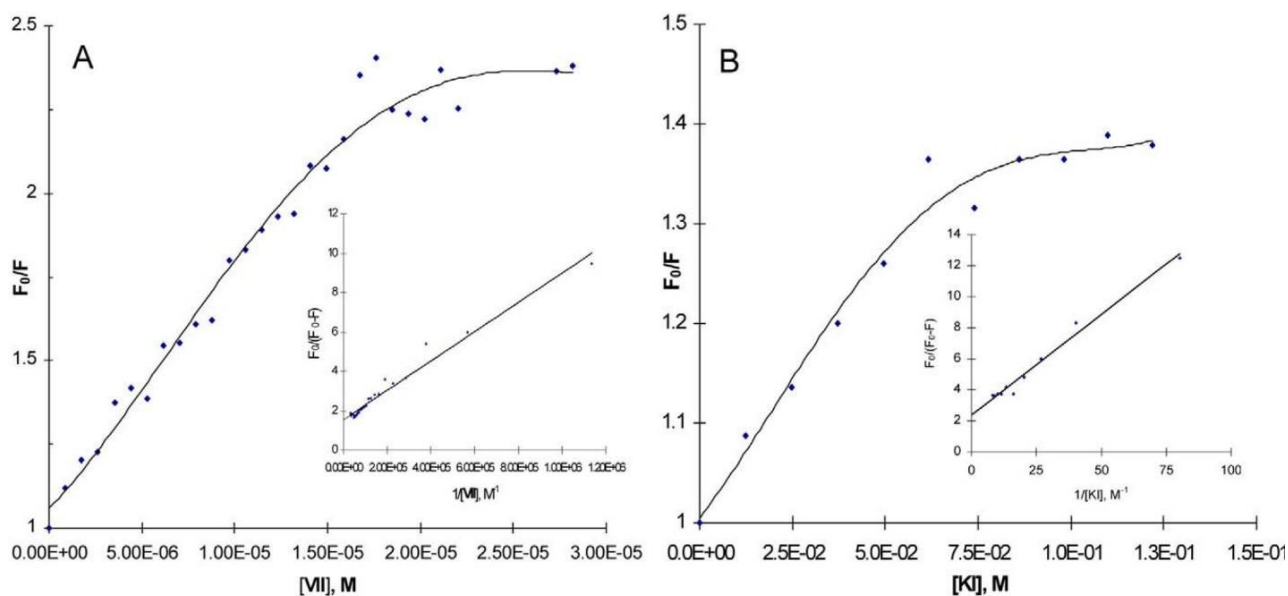


Рис. 88. Тушение флуоресценции Δ_{DUF} RpfB. А. тушение с помощью (VII). Δ_{DUF} RpfB растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,5 при концентрации 40 мг/мл. Результаты показаны на графике Штерна-Вольмера и на модифицированном графике Штерна-Вольмера (вставка). Возбуждение - 280 нм, интенсивность флуоресценции регистрировали при 340 нм. Эксперимент был выполнен 2 раза, с аналогичными результатами. Один эксперимент показан. Б. тушение с помощью KI. Подробности см. в подписи к рис. 89А. Эксперимент был выполнен 2 раза, с аналогичными результатами. Один эксперимент показан.

Наличие нескольких остатков триптофанов и фенилаланинов в молекуле Rpf позволяет анализировать взаимодействие между НФТ и Rpf путем гашения флуоресценции. Добавление высокоэффективного ингибитора ферментативной активности Rpf, соединения (VII) (таблица 13), к Δ DUF RpfB привело к значительному гашению его автофлуоресценции (возбуждение 280 и излучение 340) (Рис. 88а).

Применение стандартного уравнения Штерна-Вольмера (1) ясно показало гетерогенный тип гашения с различной доступностью остатков триптофана для ингибитора.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q[Q], \quad (1)$$

В этом случае мы применили модифицированную форму уравнения Штерна-Вольмера (2), где f_a - доступная доля флуорохромов.

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

Из уравнения (2) доступная доля триптофанов Δ DUF RpfB для соединения (VII) (f_a) была близка к 65%. Эти результаты сравнивались с гашением Δ DUF RpfB йодидом, который взаимодействует только с открытыми флуорохромами (Lakowicz, 2006). Подобно соединениям НФТ, йодид демонстрировал гетерогенный тип гашения (рис. 89В); однако доступная доля триптофанов в этом случае была оценена около 40%. Поскольку молекула Δ DUF RpfB содержит 5 остатков триптофана (основные участники аутофлуоресценции при используемом возбуждении), 65% доступности в случае (VII) соответствует трем триптофанам. 40% доступности для йодида соответствует двум экспонированным остаткам триптофана, локализованным на поверхности молекулы, что указывает на то, что вещество (VII) взаимодействовало по меньшей мере с двумя экспонированными и одним скрытым триптофаном. В случае неактивного соединения (VIII) доступная фракция была похожа на йодид (не показано).

Биологический эффект соединений НФТ был изучен на *M. luteus*, содержащем единственный ген *rpf*, необходимый для роста (Mukamolova et al., 2002с), и который является отличным 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). Кроме того, была четкая корреляция между ингибированием ферментативной активности Rpf и бактериостатическими эффектами, проявляемыми соединениями. Например, соединения (II) и (VIII) не влияли на ферментативную активность Rpf и не влияли на рост *M. luteus* (таблица 13). Тем не менее, основной известной функцией белков Rpf является реактивация покоящихся или «некультивируемых» бактерий (Kana and Mizrahi, 2010). Поэтому мы проверили влияние НФТ на реактивацию покоящихся микобактерий в двух разработанных нами моделях покоя. В первой модели большинство клеток *M. smegmatis* теряют способность образовывать колонии на агаре или расти в жидкой среде при инкубации в длительной стационарной фазе (Shleeva et al., 2004).

Такие «некультивируемые» клетки могут быть реактивированы в жидкой среде, когда белки Rpf добавляются экзогенно или сверхэкспрессируются из плазмиды с высоким числом копий (Shleeva et al., 2002, 2004).

Реактивацию считали успешной если соотношение НВЧК/КОЕ равно или превышает 1000. Как следует из Рис. 89, добавление любого НФТ-соединения (кроме (I), (II) и (VIII)) значительно подавляло реактивацию клеток *M. smegmatis*. Наблюдаемый ингибирующий эффект зависел от концентрации (Рис. 90), и наиболее активные соединения (III, IV, VII, IX) ингибировали при концентрациях 0,1–1 мкг/мл, при таких концентрациях активный рост клеток *M. smegmatis* не подавляется (не показано).

Таким образом, новый класс ингибиторов НФТ муралитической активности Rpf открывает новый путь в изучении гидролизующих клеточных стенок ферментов грамположительных бактерий, в частности микобактерий. Наблюдаемое ингибирующее действие НФТ на рост *M. luteus* отражает существенность Rpf для жизнедеятельности этой бактерии. Была выявлена хорошая корреляция между эффективностью различных НФТ в

ингибировании ферментативной активности Rpf и остановки роста клеток *M. luteus* (за исключением соединения (I)).

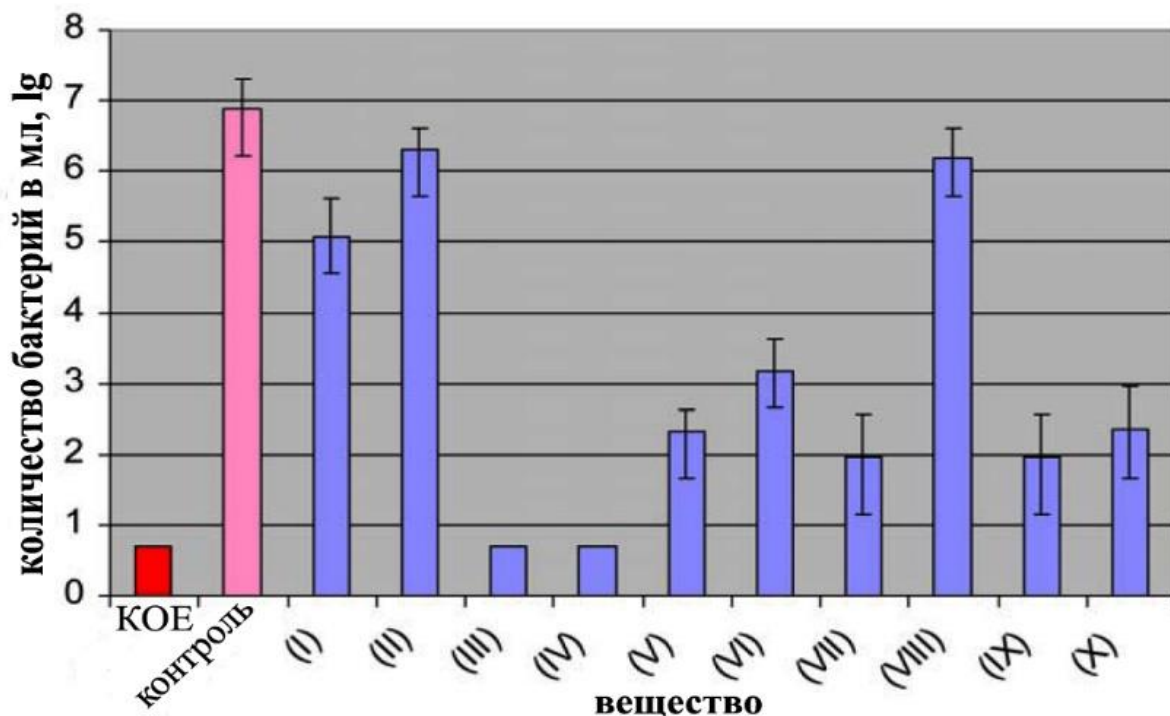


Рис. 89. Влияние соединений НФТ на реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Реактивация проводилась с помощью анализа НВЧК. Ингибиторы добавляли в количестве 1 мкг/мл в некоторые лунки. Планшеты инкубировали в течение 2 недель при 37°C при перемешивании, 100 об / мин. КОЕ культуры до реактивации составляло 5 клеток/мл. Столбцы представляют (95%) доверительные интервалы для анализа НВЧК.

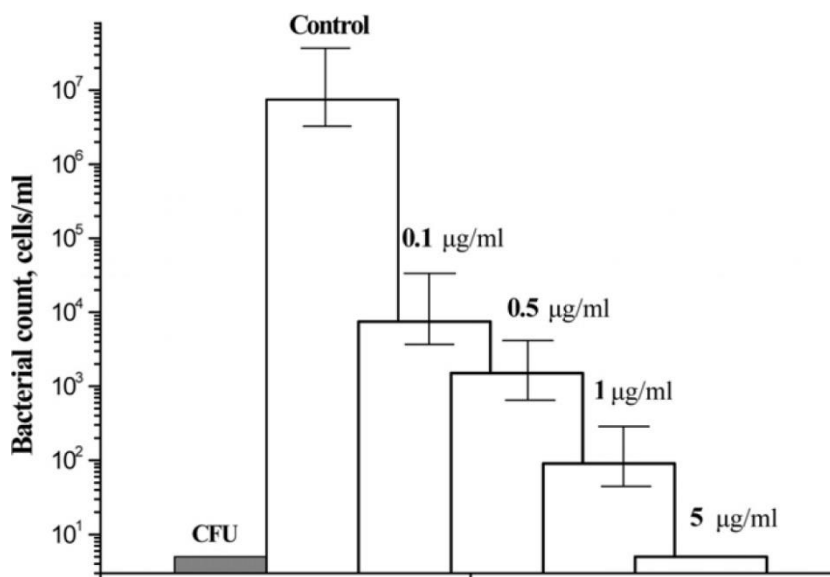


Рис. 90. Влияние соединения (IX) на реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Реактивация «некультивируемых» клеток *Msm* проводилась в жидкой среде методом НВЧК. Планшеты с реактивирующимися клетками инкубировали в течение 2 недель при 37°C со перемешиванием при 100 об/мин. Закрашенный столбец - количество КОЕ до реактивации. Открытые столбцы - количество НВЧК. Концентрации соединения

(IX), добавленного в реактивационную среду, показаны над каждым столбцом. Бары представляют (95%) доверительные интервалы для НВЧК.

Диапазон концентраций ингибирования для этих соединений также был одинаковым для обоих процессов.

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

В лаборатории Макарова В.А. были синтезированы химические вещества на основе НФТ, в которых варьировалось количество тиоцианатных и нитрогрупп, а также в их взаимное пространственное положение: среди них были бензоилфенилтиоцианаты (БФТ): (2) - (3), (5) - (6) и нитрофенилтиоцианат (НФТ): (4) (таблица 14, Рис. 91).

Таблица 14. Ингибирующее действие соединений НФТ и БФТ на Rpf-зависимый гидролиз микобактериального пептидогликана и на рост бактерий.

№	Chemical name	Formula	IC ₅₀ Rpf-hydrolysis of PG, μ M		MIC of the compound, μ M	
			<i>M. smegmatis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. smegmatis</i>
(1)	4-Benzoyl-2-nitrophenyl thiocyanate		2.4 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 2.1	25–35	18–35
(2)	3-Benzoylphenyl thiocyanate		0.4 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.4	32–42	32–42
(3)	4-Benzoylphenyl thiocyanate		0.9 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.5	25–32	21–42
(4)	Bis(4-thiocyano-3-nitrophenyl)methanone		3.7 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 2.0	47–52	26–52
(5)	Bis(4-thiocyanophenyl)methanone		2.5 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 2.4	48–51	34
(6)	Bis(3-thiocyanophenyl)methanone		2.0 $\pm$ 0.8	3.6 $\pm$ 1.2	34–41	34

Ферментативную активность рассчитывали как значение половины максимальной ингибирующей концентрации (ИК₅₀). Значения ИК₅₀ рассчитывали в ферментативном анализе Rpf-зависимого гидролиза пептидогликана (концентрация RpfV_{280–326} составляла 10 мкг/мл). Эксперимент был повторен три раза с почти идентичными результатами (показаны средние значения $\pm$ SD).

МИС оценивали как минимальную ингибирующую концентрацию соединений, достаточную для подавления активного роста бактерий. Эксперименты повторяли не менее трех раз с почти идентичными результатами (показаны средние значения $\pm$ SD).

Все соединения были протестированы на их ингибирующую активность на различных моделях скрининга. Основным критерием потенциальной эффективности этих соединений была выбрана их способность подавлять ферментативную активность каталитического домена RpfB. Для реакции использовали микобактериальный пептидогликан (выделенный из обеих бактериальных культур: *Msm* и *Mtb*), меченный FITC. Уровень гидролиза оценивали путем измерения количества FITC-меченных фрагментов пептидогликана, высвобождаемых в супернатант. Было обнаружено, что ингибирующая активность соединений, в которых отсутствуют нитрогруппы, была в несколько раз выше, чем активность контроля (1), примененного в такой же концентрации (таблица 14).

Была проанализирована способность соединений подавлять активный рост *M. luteus* (один белок Rpf у этого вида необходим для репликации) и *Msm* (быстро растущий, непатогенный близкий родственник *Mtb*, содержащий четыре гена *rpf*). Минимальные ингибирующие концентрации (МИС) синтезированных соединений, необходимые для полного подавления роста обеих бактериальных культур, определяли на жидкой среде в диапазоне концентраций 1–100 мкМ.

Тестируемые соединения БФТ были, как правило, несколько менее эффективными, чем НФТ, однако одно соединение (3, ВФТ) было очень близко к (1, НФТ) (Таблица 14). Все испытанные соединения показали сходные значения МИС, охватываемые следующими диапазонами: 25–52 мкМ для *M. luteus* и 18–52 мкМ для *Msm*. Соединения в концентрациях 25, 50 и 100 мкМ были также протестированы на их активность *in vitro* на рост активных клеток *Mtb* H37Rv. БФТ, в которых отсутствовали нитрогруппы (2), (5), (6), подавляли рост *Mtb* в концентрациях, близких к МИС, обнаруженным для *M. luteus* и *Msm*. Подавляющая эффективность этих производных, выявленная

при 50 мкМ, оказалась даже выше, чем для соединений, содержащих в своей структуре нитрогруппу (Рис. 91).

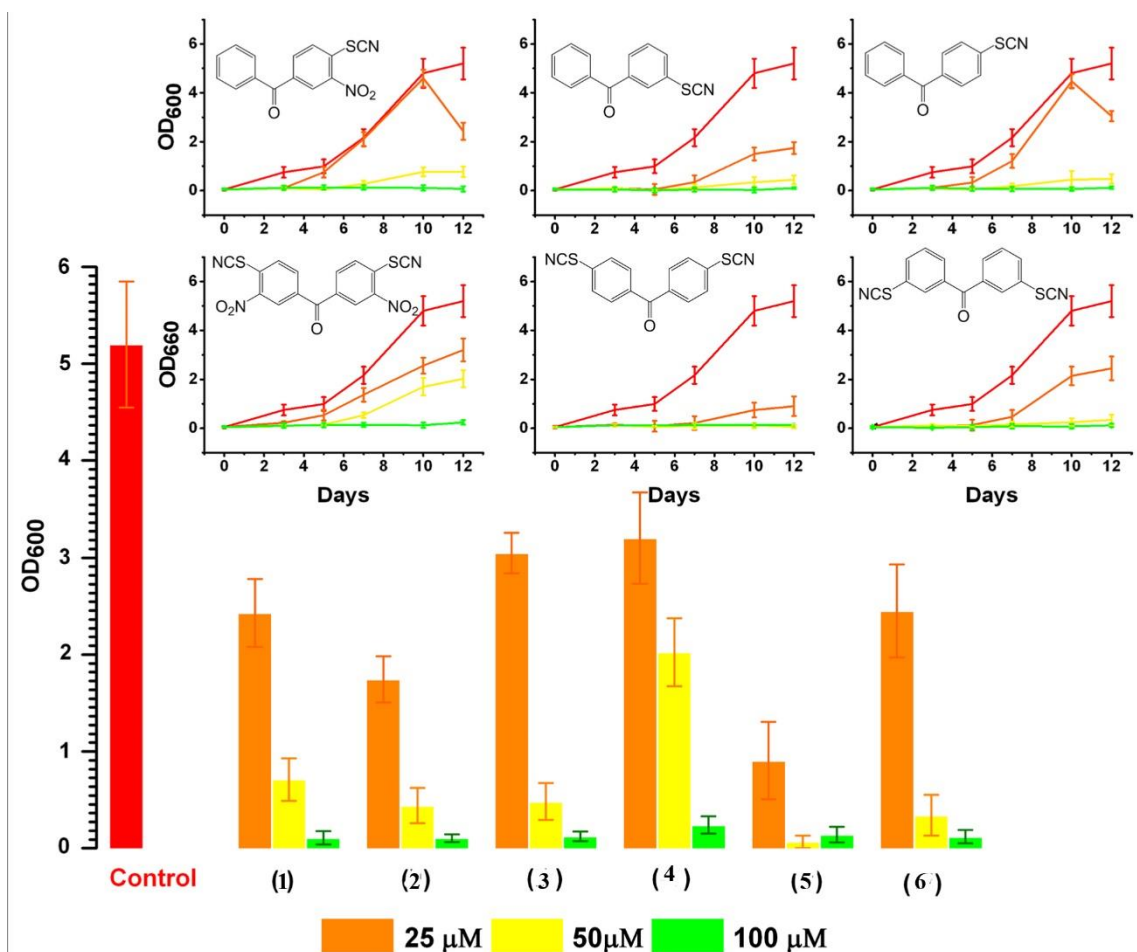


Рис. 91. Влияние соединений НФТ и БФТ на активный рост *M. tuberculosis*. Клетки выращивали в течение 12 дней. Гистограмма показывает ингибирующий эффект тестируемых соединений на 12-й день от начала эксперимента. На вставке показаны кривые роста в присутствии ингибиторов и контроля (без добавления соединений). Соединения добавляли в концентрациях 25, 50, 100 мкМ в трех повторностях (показаны разными цветами). Столбики ошибок представляют стандартное отклонение измерений. Арабские цифры в скобках соответствуют номерам соединений, перечисленным в таблице 13.

Однако полное подавление роста (98–99%) проявляется при концентрации соединений 100 мкМ. Отобранные БФТ были исследованы на их способность подавлять реактивацию покоящихся «некультивируемых» форм *Mtb* (Рис. 90). Поскольку было показано, что синтезированные производные подавляют рост активных клеток, мы использовали концентрацию 25 мкМ, что может дать бактериальной культуре возможность развить видимую ОП (необходимую для оценки НВЧК). Количество реактивированных из состояния покоя клеток оценивали с помощью метода НВЧК. Из рисунка 92 видно, что наиболее

активными оказались соединения, содержащие одну тиоцианатную группу, замещенную в мета- и пара-положении по отношению к бензофеноновому ядру - (2) и (3) вещества соответственно. Очевидно, что соединения, в которых отсутствуют нитрогруппы, демонстрируют заметное ингибирующее влияние на реактивацию *M. tuberculosis*.

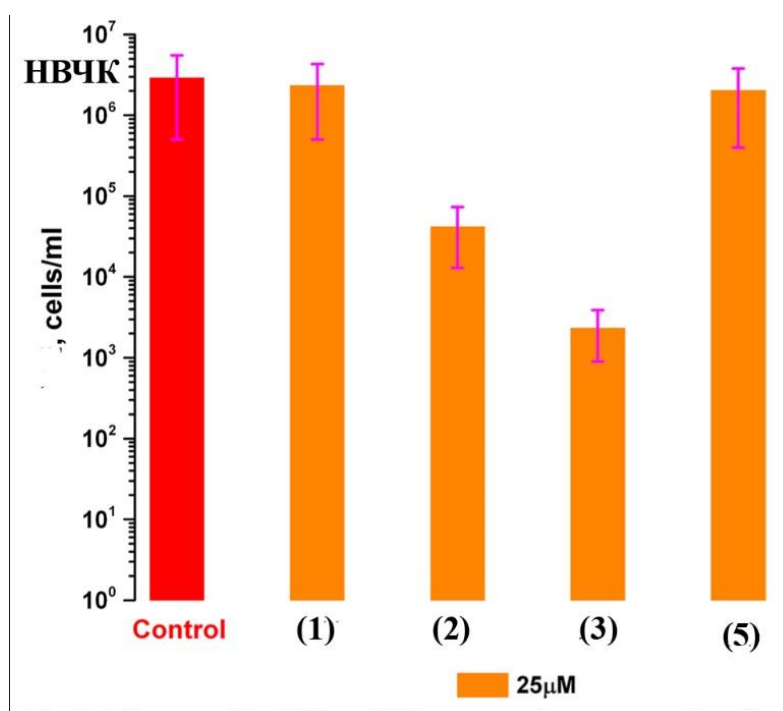


Рис. 92. Влияние соединений НФТ и БФТ на подавление реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Процесс реактивации оценивался с помощью стандартного анализа НВЧК (подробности см. в разделе «Методы»). Соединения тестировали в концентрации 25 мкМ в трех повторностях. Планшеты инкубировали в течение 40–60 дней без встряхивания при 37°C. Бары представляют стандартное отклонение измерений. Цифры в скобках соответствуют номерам соединений, перечисленным в таблице 13.

Специфические взаимодействия (образование водородных связей) были опосредованы главным образом тиоцианатной функциональной группой НФТ, которая, как было обнаружено, взаимодействует с аминокислотными остатками каталитического домена (среди них Asp312, Glu 292), тогда как нитрогруппа не участвует в этом процессе. Эти результаты позволяют предположить, что тиоцианатная группа, связанная с фенильным кольцом (и сами по себе арилы бензофенона), являются ключевыми компонентами для инактивации каталитической активности молекулы RpfB. Ферментативный анализ выявил потенциальную способность тестируемых соединений

ингибировать ферментативную активность белка Rpf. Биологический эффект вновь синтезированных соединений был протестирован на Rpf-продуцирующих бактериях: *M. luteus* и *M. smegmatis*, и оценивался по подавлению активного роста в жидкой среде. Было обнаружено, что БФТ ингибируют рост *M. luteus*, также, как и НФТ (вследствие важности гена *rpf* для этой бактерии). Также было показано, что БФТ и НФТ подавляют рост *M. smegmatis*. Некоторые из БФТ (2), (5), (6) продемонстрировали умеренное ингибирующее влияние на рост *Mtb* в жидкой среде. Сравнение данных по ингибирующей активности испытуемых соединений (таблица 14, Рис. 92) демонстрирует сильную корреляцию между эффективностью торможения гидролитической активности белка Rpf и процессом реактивации покоящихся клеток *Mtb*. В обоих случаях соединения, лишенные нитрогруппы проявляли одинаковый уровень активности, схожий для НФТ, а иногда даже выше для соединений (2), (3), подтверждая предложенную гипотезу экспериментально. Выявленная корреляция между антиферментативной и антиреактивационной активностями, наблюдаемыми для НФТ, делает их привлекательными для использования в изучении механизма действия белка Rpf и его роли в реактивации покоящихся микобактерий.

3.3.5.2. От свободных ненасыщенных жирных кислот к белкам Rpf.

Важность белков Rpf для реактивации покоящихся «некультивируемых» клеток *Mtb in vitro* и для роста жизнеспособных клеток *in vivo* была подтверждена при исследовании нокаутированных по Rpf мутантных штаммов *Mtb*. Несмотря на то, что эти мутанты были дефектными в плане реактивации хронического туберкулеза, возможное значение Rpf для установления и поддержания скрытого туберкулеза еще предстоит выяснить. Итак, нами было продемонстрировано, что 2-нитрофенилтиоцианаты ингибируют Rpf-зависимую реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm*. НФТ ингибировали индуцированную олеиновой кислотой реактивацию и рост «некультивируемых» клеток *Msm* (Рис. 93а). Подобный эффект для НФТ был

обнаружен и в случае цАМФ - индуцируемой реактивации «некультивируемых» клеток *Msm* (Рис. 93б). Важно отметить, что в этих экспериментах НФТ применяли в концентрациях, которые не влияли на рост активно растущих клеток *Msm*. Этот эксперимент демонстрирует, что ЖК-индуцированная реактивация «некультивированных» клеток *Msm* связана с белками семейства Rpf. Интересно, что реактивирующиеся микобактерии, инкубированные в присутствии НФТ и олеата, показали повышенное включение урацила (см. вставку в Рис. 93а). Нормализация включения урацила на одну жизнеспособную клетку дает значения 900–1000 импульсов в минуту на 10^3 клеток для активно делящихся бактерий в экспоненциальных культурах и 1500–2000 импульсов в минуту на 10^3 жизнеспособных клеток, присутствующих после реактивации «некультивируемых» клеток в течение 92 ч (количество жизнеспособных клеток оценивалось с использованием анализа 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.

Наконец, мы определили, сопровождается ли повышение внутриклеточной концентрации цАМФ, наблюдаемое в результате экзогенного введения СНЖК, повышенной экспрессией генов *rpf* в течение периода реактивации (в лаг фазе). Для этого был проведен анализ уровня экспрессии этих генов методом количественного ПЦР в реальном времени с использованием равных количеств общей РНК, выделенной из клеток, отобранных в разные моменты реактивации. Как и ожидалось, количество РНК, выделенной из «некультивируемых» бактерий, было намного ниже, чем количество, полученное из активно размножающихся клеток. В наших условиях реактивации мы обнаружили, что 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. 94).

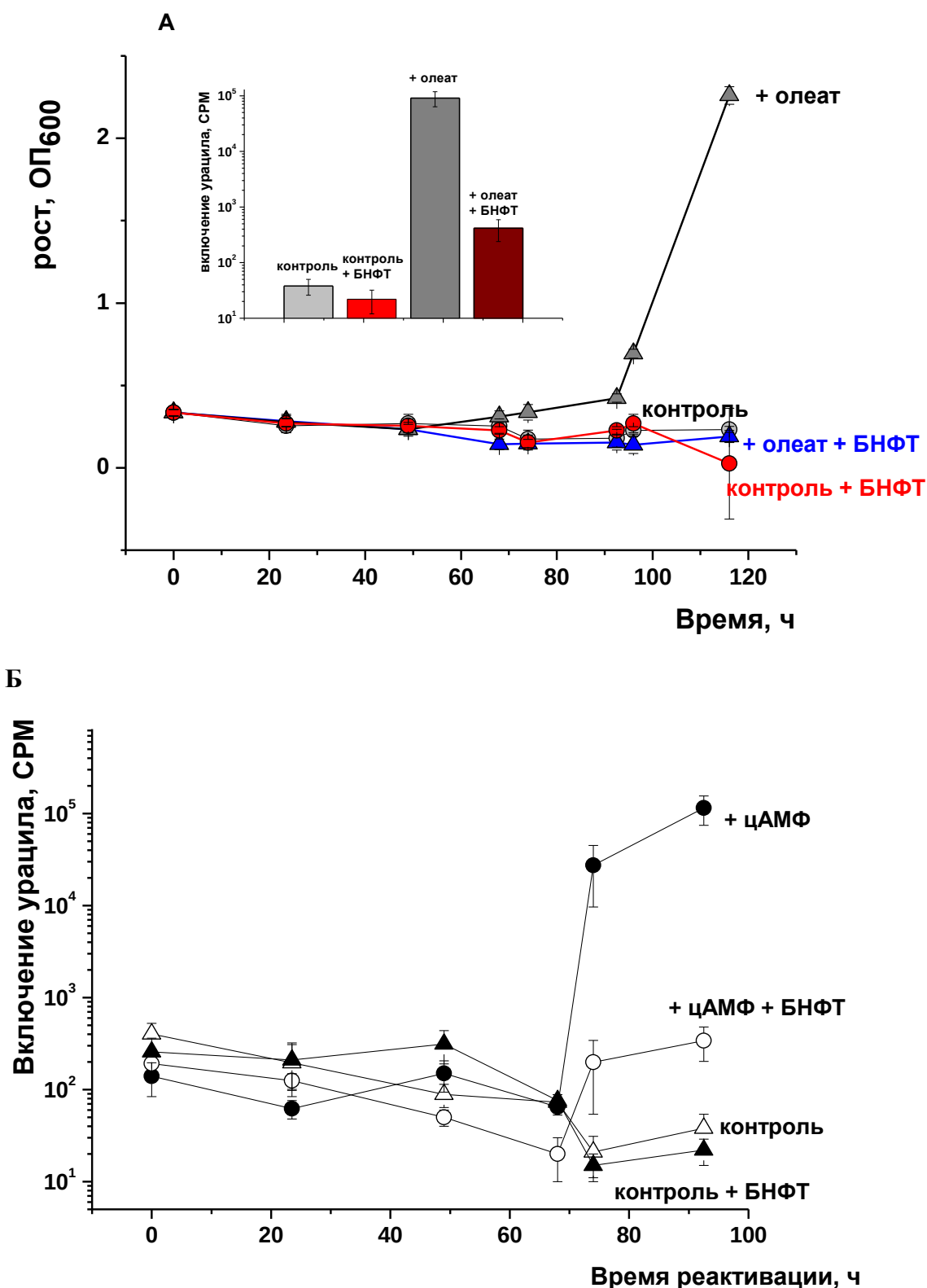


Рис. 93. Индуцируемая олеиновой кислотой реактивация «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* зависит от Rpf. ПМ реактивировали в жидкой среде в присутствии и в отсутствие как олеиновой кислоты (3,5 мМ) (А), так и цАМФ (3,0 мМ) (Б) и ингибитора Rpf, НФТ (1 мкг/мл) во всех четырех возможных комбинациях, 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.

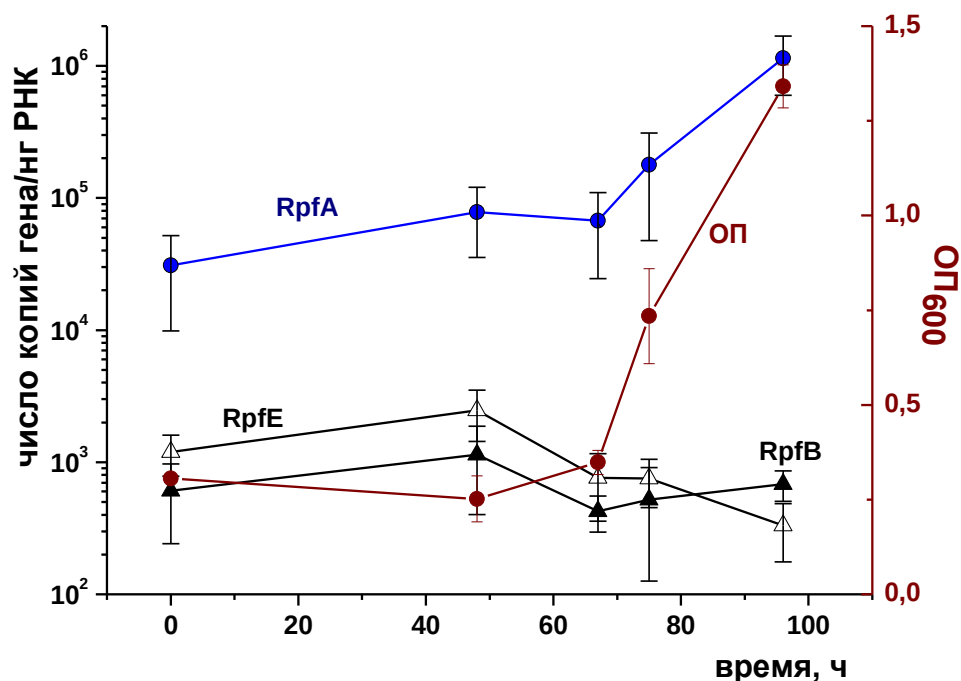


Рис. 94. Профили экспрессии трех генов *rpf* *M. smegmatis* во время индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» клеток. Олеиновую кислоту добавляли в концентрации 3,5 мкМ и исходная плотность культуры соответствовала $OD_{600} = 0,3$. РНК выделяли из клеток, отобранных из культуры в разные моменты времени. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием равных количеств РНК (50 нг), как описано в разделе «Материалы и методы». Каждая точка является средним из девяти измерений (три технических повтора трех биологических повторностей). Средние значения OD_{600} для трех повторных культур также показаны. Бары представляют стандартное отклонение. Значение между уровнем экспрессии MSMEG_5700 после 67 ч инкубации было оценено с помощью ANOVA ($P < 0,05$).

Через 67 часов, в ранней логарифмической фазе, для *rpfA* выявлено значительное увеличение уровня экспрессии, тогда как уровни экспрессии *rpfB* и *rpfF* демонстрировали незначительные изменения (Рис. 94). Четвертый ген *rpf* (*MSMEG_4640*), обнаруженный в этом организме, не может быть отслежен, поскольку мы не смогли сконструировать специфические праймеры для этого гена. В контрольной культуре (без добавления СНЖК) количество копий генов *rpfA*, *rpfB* и *rpfF* оставалось постоянным в течение всего эксперимента (данные не показаны). Этот эксперимент, наряду с результатами, полученными с применением НФТ, демонстрирует, что в процесс реактивации, стимулированной ЖК, вовлечен белок RpfA, необходимый для полноценного роста микобактерий.

Примечательно, что из трех генов *rpf*, оцененных в этом исследовании, *rpfA* был единственным, который показал усиленную экспрессию во время реактивации. Rickman с соавторами (Rickman et al., 2005) предположили, что Rv3676 может контролировать реактивацию покоящихся клеток. Интересно, что у *Corynebacterium glutamicum* ген *rpf2* (гомолог *rpfB* у *Mtb*) также находится под положительным контролем цАМФ-зависимого регулятора транскрипции GlxR, который является гомологом Rv3676. Однако гиперэкспрессия GlxR приводила к усилению экспрессии *rpf2*, когда бактерии росли на ацетате, но не когда они росли на глюкозе (Jungwirth et al., 2008). Из приведенного выше обсуждения очевидно, что любая возможная связь между уровнями цАМФ и индукцией экспрессии гена *rpf* в фазе реактивации далеко не проста. В наших экспериментах мы обнаружили, что добавление ингибитора Rpf (НФТ) предотвращает реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm* в присутствии олеиновой кислоты (Рис. 93а). Этот эксперимент подтверждает участие Rpf в ЖК-индуцированной реактивации микобактерий. Наблюдаемая активация транскрипции *rpfA* (Рис. 94) говорит 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 происходило спустя некоторое время после того, как внутриклеточный уровень цАМФ увеличился (Рис. 77 и 94). Поскольку повышенная регуляция *rpfA* не предшествовала началу размножения клеток, RpfA может, следовательно, контролировать ускорение размножения клеток посредством Rpf-зависимого ремоделирования клеточной стенки (Kana and Mizrahi, 2010) в ранней логарифмической фазе в качестве позднего события (через 67 ч, Рис. 94), что позволяет успешно развивать рост. Таким образом, процесс реактивации можно разделить на три фазы, как показано на рисунке 77: фаза истинной лаг фазы (0), метаболическая реактивация (I) и размножение клеток (II). Действительно, секреция белков Rpf в культурах *Msm*

коррелировала с активным ростом, но не с лаг-фазой (Shleeva et al., 2004). 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 I, рисунок 75), и не похоже, что их роль, напрямую связана с активностью Rpf (Рис. 92). Однако мы не можем исключить возможность того, что цАМФ может контролировать экспрессию *rpf* на более ранней стадии процесса реактивации, поскольку существует значительная гетерогенность в популяциях покоящихся клеток.

Таким образом, был выявлен новый путь реактивации, в котором свободные жирные кислоты играют роль исходного индуктора. Поскольку микобактерии содержат ряд АЦ, которые реагируют на различные стимулы окружающей среды (Bai et al., 2011), мы не можем исключить возможность того, что могут существовать и другие сигналы «нарушения покоя». Поскольку липиды являются, по-видимому, важными питательными веществами для *Mtb* во время роста в тканях животных (Bishai, 2000; Russell et al., 2010), наблюдаемая реактивационная активность ЖК может означать, что в определенных условиях организма хозяина *in vivo*, где концентрации ЖК являются подходящими, микобактериальные клетки постоянно получают '«сигналы, вызывающие реактивацию», которые не позволяют им перейти в действительно покоящееся состояние.

На основании этих данных мы предполагаем связь в период реактивации между веществами липидной природы и белками Rpf. Олеиновая кислота, которая также может высвободиться вследствие деградации фосфолипидов, выступает стимулятором аденилатциклазы, что приводит к увеличению концентрации цАМФ в клетке. Каким образом концентрация цАМФ приводит к модуляции генов *rpf*, остается неясным. Возможно, что экспрессия *rpfA* связана с цАМФ-зависимым транскрипционным фактором. Реактивация ПФ *M. smegmatis* может происходить под действием разных индукторов, как

белков Rpf, так и СНЖК. Мы предполагаем, что оба механизма реактивации ПФ *M. smegmatis* являются звеньями одной цепи.

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

Согласно первоначальной гипотезе, Rpf рассматривался как бактериальный цитокин, который связывается с внеклеточным рецептором, что приводит к стимуляции роста (Mukamolova et al., 1998). Однако все попытки найти рецептор провалились. Недавние структурные исследования продемонстрировали четкую гомологию Rpf с лизоцимом и литическими трансгликозилазами (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Кристаллическая структура домена, сохраненного в семействе Rpf, выявила лизоцимоподобную складку с-типа (Ruggiero et al., 2009), и было предсказано, что в результате ферментативной активности этого белка будет расщепляться гликозидная связь между N-ацетилглюкозамином и N-гликолилмурамовой кислотой в пептидогликане клеточной стенки (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Муралитическая активность белков Rpf была подтверждена экспериментально путем демонстрации способности Rpf расщеплять субстраты, подобные клеточной стенке *M. luteus* (Mukamolova et al., 2006). Однако вопрос о том, как гидролиз пептидогликана инициирует реактивацию, все еще оставался неясным. Возможность того, что Rpf высвобождает низкомолекулярные вторичные мессенджеры, действующие как сигнальные молекулы (молекулы муропептидов), ранее обсуждалась (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Mukamolova et al., 2006). Однако участие продуктов расщепления пептидогликана в реактивации покоящихся «некультивируемых» микобактерий ранее не было продемонстрировано.

Хотя ранее было показано, что Rpf способен гидролизовать клеточную стенку *M. luteus* (Mukamolova et al., 2006), такая активность в отношении микобактериального ПГ еще не была продемонстрирована. В нашем

исследовании способность рекомбинантного Rpf из *M. luteus* (RpfSm) гидролизовать клеточные стенки микобактерий изучалась с использованием флуоресцентно-меченных препаратов изолированного ПГ (Mukamolova et al., 2006). Инкубация меченого ПГ из *M. smegmatis* в присутствии RpfSm приводила к высвобождению флуоресцентного материала в супернатант, выявляемого после центрифугирования обработанных клеточных стенок (Рис. 95). RpfSm также был способен расщеплять клеточные стенки *M. tuberculosis*, однако в меньшей степени, чем в случае *M. smegmatis* (Рис. 95).

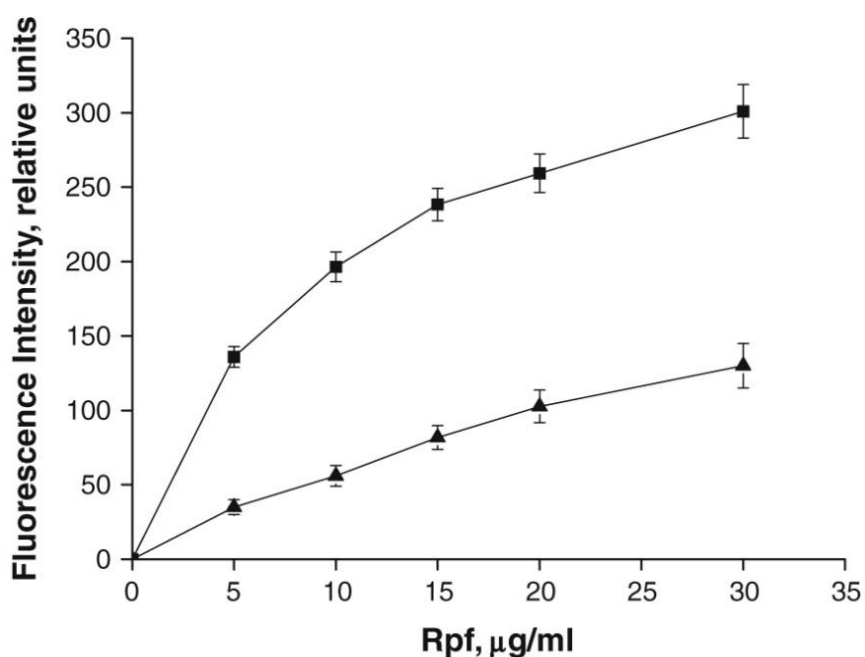


Рис. 95. Гидролиз микобактериального пептидогликана в присутствии Rpf. Квадраты - пептидогликан *M. smegmatis*, треугольники - пептидогликан *M. tuberculosis*., Микобактериальный пептидогликан, обработанный FITC, растворяли в реакционном буфере. К образцам добавляли рекомбинантный RpfSm в различных концентрациях и инкубировали при 37°C в течение 72 часов. Уровень гидролиза оценивали путем измерения появления флуоресценции FITC в супернатанте (возбуждение = 496 нм; испускание = 525 нм) после центрифугирования.

Наблюдаемое расщепление ПГ было специфическим, поскольку в присутствии эффективных ингибиторов Rpf 1,5-динитро-2,4-бистиоцианатобензола и 3-нитро-4-тиоцианатофенил-фенилметанона подобный эффект не наблюдался (данные не показаны). Фрагменты клеточной стенки *Msm*, выделившиеся после расщепления в присутствии RpfSm, использовали в экспериментах по реактивации покоящихся микобактерий.

Для этих исследований были использованы «некультивируемые» покоящиеся клетки *Msm*, полученные после длительного культивирования в среде с дефицитом калия (Shleeva et al., 2004). Такие клетки способны к реактивации в жидкой среде в присутствии экзогенно добавленного рекомбинантного белка Rpf (Shleeva et al., 2004). В этих экспериментах эффективность реактивации оценивали путем сравнения жизнеспособности «некультивируемых» клеток (оцениваемой путем определения КОЕ на плотной среде) и анализа НВЧК (в жидкой среде). «Некультивируемые» микобактерии, полученные в этой модели, не были способны к самопроизвольной реактивации при пересеве в свежую жидкую среду, не содержащую индукторов и стимуляторов роста, т.е. значения НВЧК и КОЕ были близки (Shleeva et al., 2004).

Продукты гидролиза клеточной стенки, внесенные в жидкую среду, стимулировали реактивацию клеток, судя по увеличению отношения НВЧК/КОЕ. Как видно из Рис. 96а, этот эффект варьировался от эксперимента к эксперименту, но в среднем разница составляла около двух порядков. При этом концентрация ФПГ была критичной для успешности реактивации (Рис. 96б). Оба анализа КОЕ (CFU) и НВЧК (MPN) 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. 96а). Эта стимуляция была специфичной для фрагментов ПГ, так как микобактериальный арабиногалактан не стимулировал реактивацию (Рис. 96а). Важно отметить, что максимальный эффект в отношении реактивации с помощью фрагментов ПГ был обнаружен в довольно узком диапазоне концентраций этих фрагментов (около 0,1 мкг / мл) (Рис. 96б).

Аналогичные эффекты фрагментов ПГ наблюдались при реактивации покоящихся форм *M. tuberculosis* (Рис. 97), хотя оптимальная концентрация фрагментов составляла около 0,2 мкг / мл (данные не показаны).

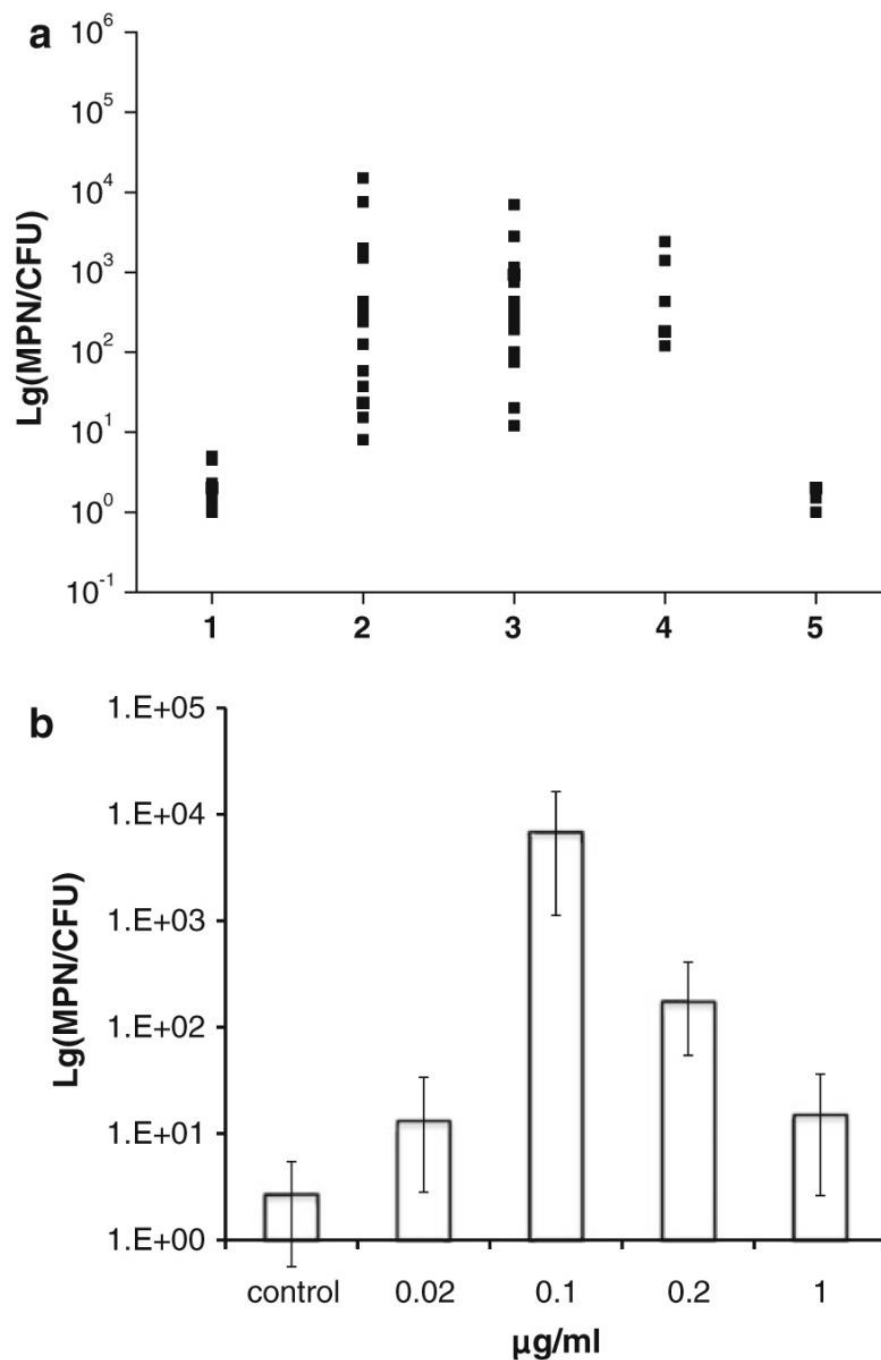


Рис. 96. Влияние продуктов Rpf-зависимого гидролиза микобактериального пептидогликана на реактивацию «некультивируемых» *M. smegmatis*. А) 1 - контроль - самореактивация (без добавок), реактивацию стимулировали добавлением следующих индукторов: 2 - RpfSm (5 нг / мл), 3 - фрагменты пептидогликана, полученные в результате обработки микобактериального ПГ с помощью RpfSm (100 нг / мл), 4 - механически разрушенный микобактериальный ПГ (обработанный ультразвуком ПГ, 200 нг / мл), 5 - арабиногалактан (100 нг / мл). Каждая точка на графике представляет результаты одного отдельного эксперимента. В среднем 95% доверительный интервал для индекса реактивации (MPN / CFU) составлял не более половины порядка для высоких и низких уровней каждой точки. Б) Кривая концентрации. 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 значительными ($p \leq 0,05$).

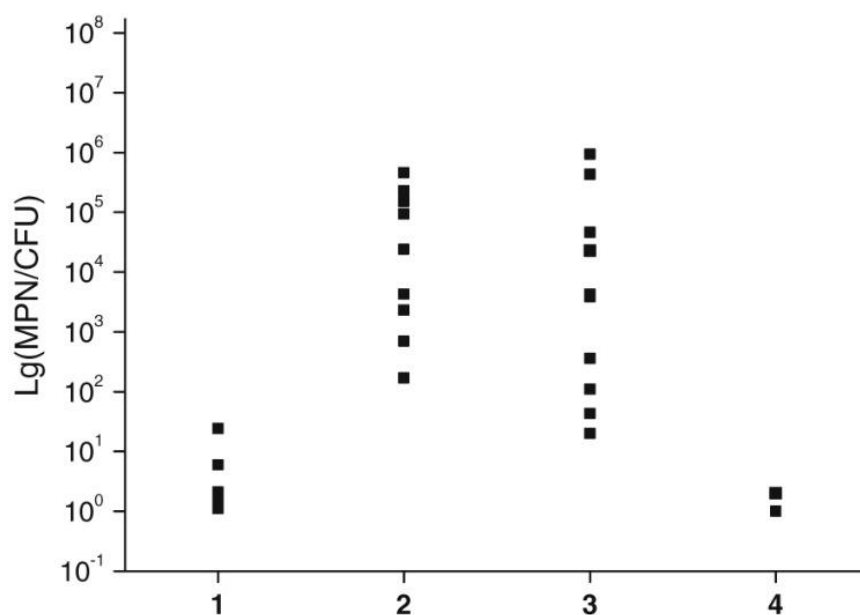


Рис. 97. Влияние продуктов Rpf-зависимого гидролиза микобактериального пептидогликана на реактивацию «некультивируемых» покоящихся клеток *M. tuberculosis*. 1 - контроль - самореактивация (без индукторов), реактивацию стимулировали внесением следующих веществ: 2 - RpfSm (5 нг / мл), 3 - фрагмента пептидогликана, полученного в результате обработки ПГ из *M. smegmatis* с помощью RpfSm (200 нг / мл), 4 - арабиногалактана (200 нг / мл).

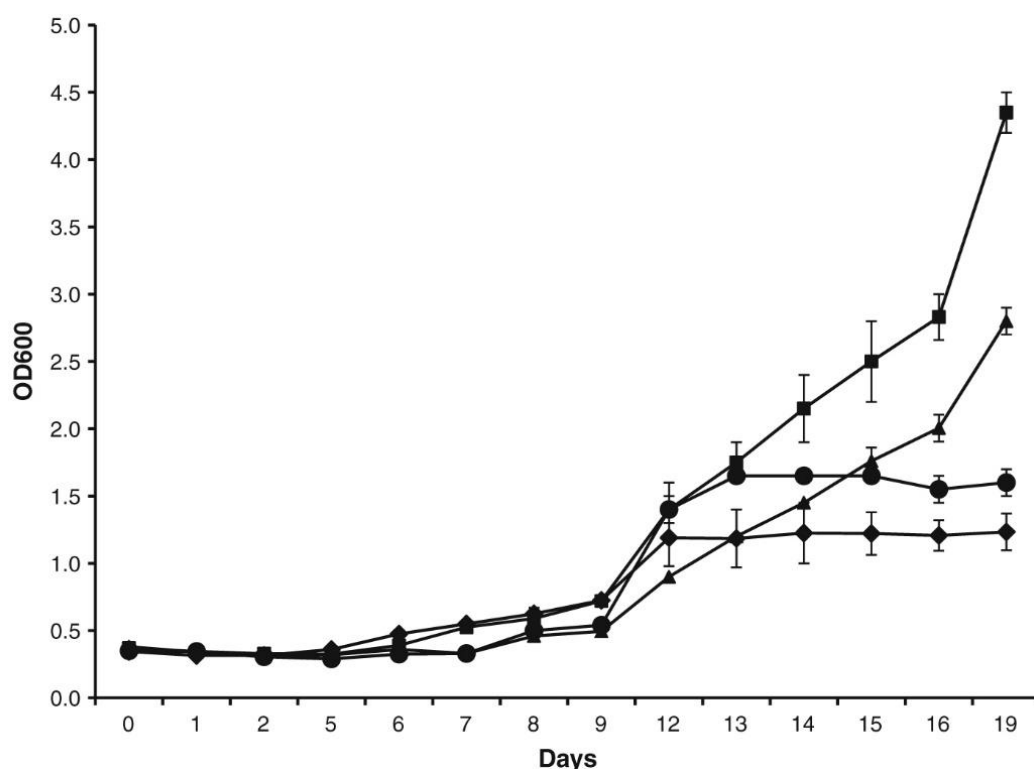


Рис. 98. Стимуляция роста *M. tuberculosis* продуктами Rpf-зависимого гидролиза микобактериального ПГ. Ромбы - контроль - самореактивация (без индукторов); фрагменты ПГ из *M. smegmatis*: квадраты - 0,2 мкг / мл, треугольники - 2 мкг/мл, кружки - 20 мкг/мл. График представляет собой среднее из двух независимых экспериментов. Каждая точка в среднем состоит из трех биологических повторностей. OD600 периодически измеряли во время реактивации.

Фрагменты ПГ не только стимулировали процесс реактивации, но также продемонстрировали способность стимулировать скорость роста стрессированных клеток *M. tuberculosis* (Рис. 98).

Чтобы выяснить, была ли стимуляция реактивации вызвана только присутствием низкомолекулярных продуктов (например, муропептидов), фрагменты клеточной стенки, полученные после воздействия RpfSm, подвергали диализу против буфера, сохраняя, таким образом, только высокомолекулярную массу. Эта процедура не влияла на реактивационную активность высокомолекулярной фракции, остающейся в диализном мешке (Рис. 99а), что указывает на то, что фрагменты ПГ с молекулярной массой >10 кДа были также способны стимулировать реактивацию. Чтобы проверить эту идею, мы разрушили выделенный ПГ с помощью ультразвука вместо действия RpfSm. Мы обнаружили, что фрагменты, полученные после центрифугирования клеточных стенок, обработанных ультразвуком в течение 60 с, обладают стимулирующей реактивацию активностью в отличие от не обработанных ультразвуком клеточных стенок (данные не показаны). Подобно фрагментам ПГ, полученных в результате действия белка Rpf, стимулирующая реактивацию активность обработанных ультразвуком фрагментов сохранялась после диализа, хотя оптимальная концентрация фрагментов для максимальной активности была смещена в сторону более высоких значений (Рис. 99б). Анализ распределения частиц по размеру методом динамического рассеяния света (ДРС) показал, что диализированный материал содержит смесь фрагментов с размерами от 0,1 до 0,5 мкм (Рис. 100).

Наблюдаемая стимулирующая реактивацию активность относительно крупных фрагментов ПГ может быть обусловлена либо их непосредственным связыванием с клетками с последующей активацией процесса реактивации, либо они могут служить субстратом для эндогенных белков Rpf, что приводит к образованию низкомолекулярных продуктов, которые непосредственно стимулируют реактивацию.

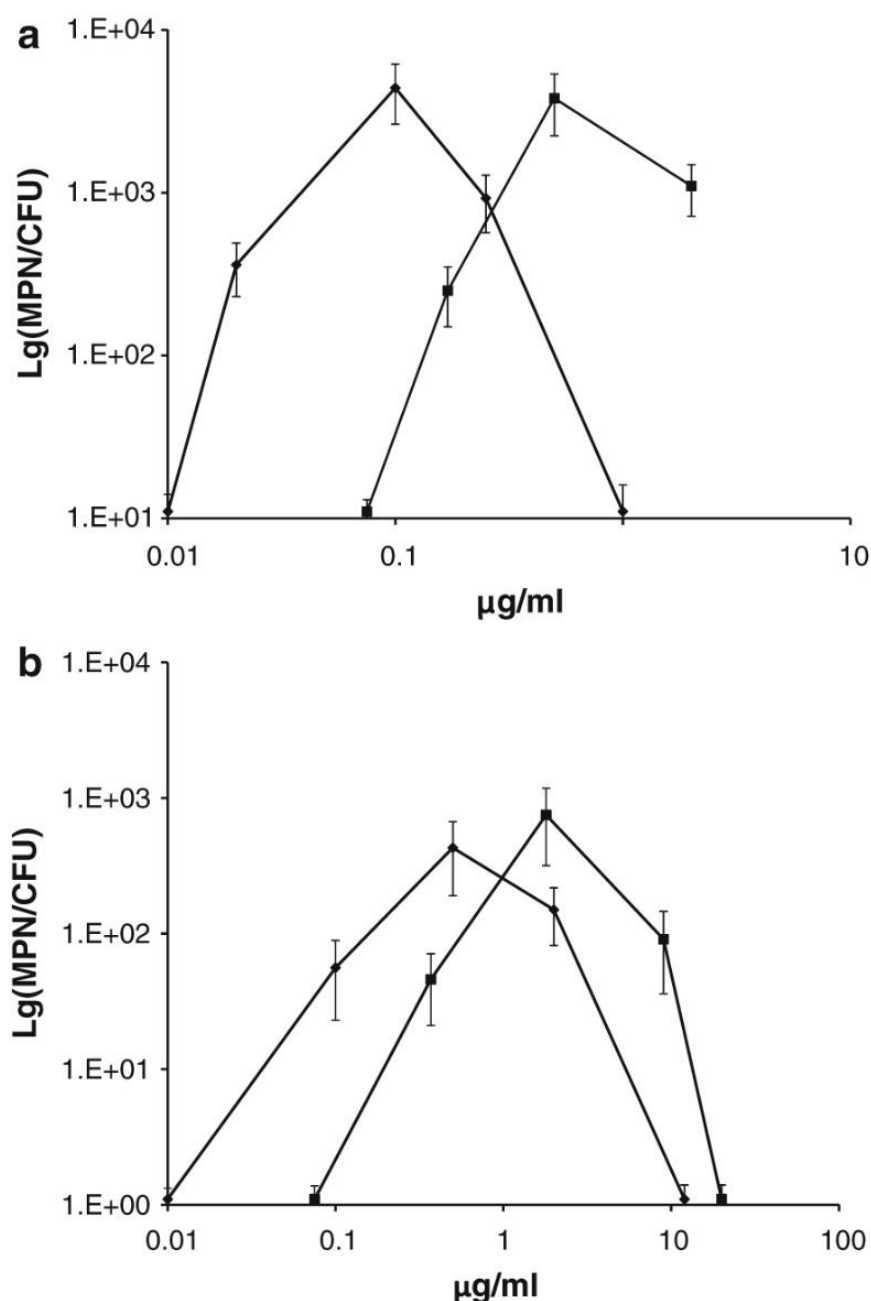


Рис. 99. Влияние на реактивацию микобактерий фрагментов ПГ из *M. smegmatis* до и после диализа. Концентрационная зависимость. а) Фрагменты, полученные после обработки ПГ белком Rpf. б) Фрагменты, полученные после обработки ПГ ультразвуком. Ромбы - фрагменты ПГ до диализа, квадраты - диализированные в течение ночи фрагменты ПГ. Бары представляют (95%) доверительные интервалы для анализа НВЧК (MPN).

Чтобы проверить эти возможности, мы применили один из исследованных нами Rpf-специфических ингибиторов, принадлежащий к семейству НФТ. Поскольку ингибитор 4-бензоил-2-нитрофенилтиоцианат полностью устранял стимулирующую реактивацию активность

диализированных фрагментов ПГ (Рис. 101), этот результат, по-видимому, подтверждает вторую возможность.

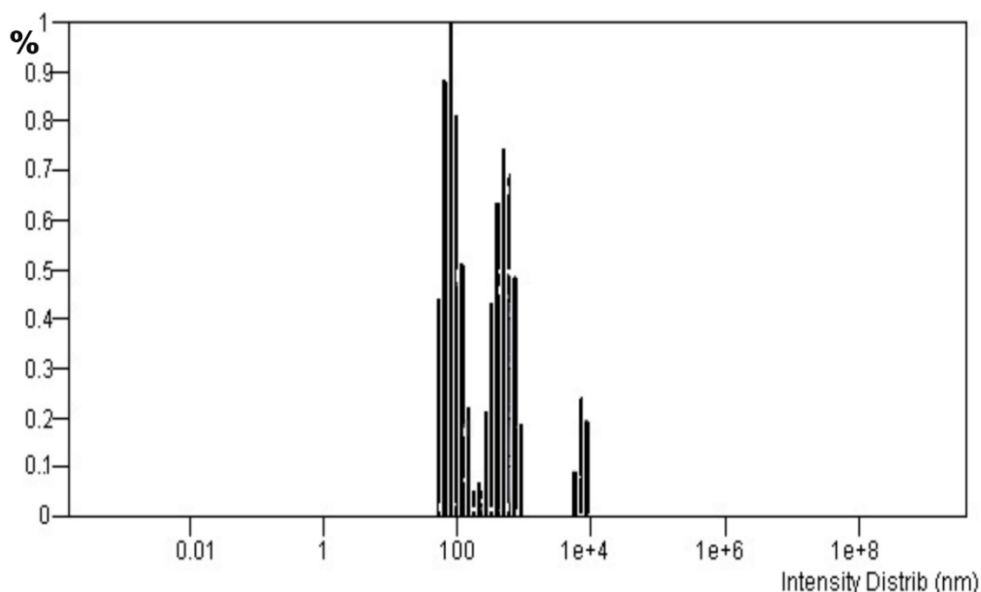


Рис. 100. Определение размера фрагментов ПГ методом ДРС. Распределение частиц по размеру анализировали методом динамического рассеяния света (ДРС) с использованием фотонного спектрометра («PhotoCor Instrument») с He-Ne-лазером в качестве источника света, излучающего монохроматический луч с длиной волны 633 нм. Образец помещали в цилиндрическую кварцевую кювету (0,4 мл). Сигнал был обнаружен фотонно-счетной системой PhotoCor-PC. Полученные данные проанализированы с помощью программного обеспечения DynaLS.

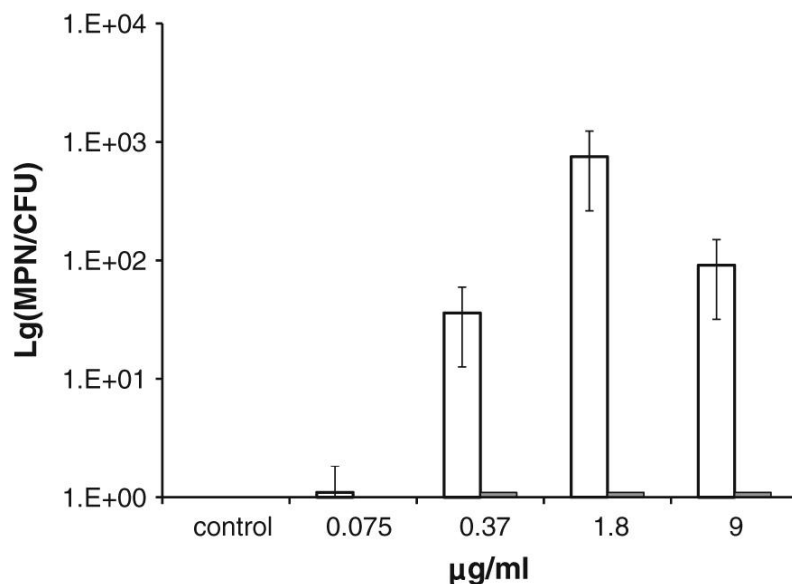


Рис. 101. Влияние фрагментов ПГ *M. smegmatis*, полученных после диализа, на реактивацию «некультивируемых» микобактерий в присутствии ингибитора Rpf. Фрагменты ПГ после диализа в присутствии или в отсутствие ингибитора добавляли в жидкую среду: белые столбики – реактивация без ингибитора, серые столбики – реактивация в присутствии 6 мкМ 4-бензоил-2-нитрофенилтиоцианата. Бары представляют (95%) доверительные интервалы для анализа НВЧК (MPN).

Важно отметить, что ингибитор не влиял на рост жизнеспособных клеток *Msm* в используемых концентрациях, но подавлял реактивацию «некультивируемых» бактерий.

Согласно структурным исследованиям, консервативная часть Rpf может рассматриваться как гибрид литических трансгликозилаз и лизоцима (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Было высказано предположение, что механизм гидролизующей активности белков Rpf в отношении ПГ наиболее сходен с лизоцимом с-типа (Ruggiero et al., 2009). Однако ранее гидролитическая активность Rpf в отношении ПГ микобактерий экспериментально не была продемонстрирована. Несмотря на глубокое понимание структуры Rpf, остается неясным, как его ферментативная активность стимулирует реактивацию покоящихся микобактерий. Один из возможных механизмов заключается в том, что Rpf может непосредственно участвовать в заключительном этапе деления клетки, отделяя соседние клетки при помощи ограниченного гидролиза ПГ. В пользу этого предположения говорит факт дезагрегации клеточных агрегатов при добавлении Rpf к культурам *M. smegmatis* и *M. luteus* (Nikitushkin et al., 2011). Однако этот эффект наблюдался, когда концентрации Rpf были намного выше, чем концентрации, используемые для стимуляции реактивации. Стоит также отметить, что концентрации клеток, использованные в этих экспериментах, также были намного выше, чем в процедуре реактивации. Другое предположение относительно участия Rpf в реактивации состоит в том, что Rpf действует косвенно, гидролизуя ПГ бактериальных клеток и высвобождая активные продукты гидролиза. Эти продукты (предполагаемые муропептиды) служат триггером для последовательности событий, в конечном итоге приводящих к реактивации. Подтверждение этой гипотезы пришло из открытия способности спор *Bacillus subtilis* прорасти под влиянием высвобожденных муропептидов в супернатанте (Dworkin and Shah, 2010; Shah et al., 2008). 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 «реактивационными сигналами» (Mukamolova et al., 2006). Несмотря на то, что эта идея была сформулирована в ряде публикаций (Dworkin and Shah, 2010; Kana and Mizrahi, 2010; Keep et al., 2006; Molle and Kremer, 2010; Shah et al., 2008), она не была экспериментально проверена до нашего исследования. В исследовании Mir с соавторами (Mir et al., 2011) несколько химически синтезированных муропептидов были изучены на предмет их стимулирующей реактивацию активности в отношении покоящихся культур *M. tuberculosis*. Это исследование продемонстрировало очень слабый реактивационный эффект для двух типов муропептидов с максимальной аффинностью к экстрацитоплазматическому домену PknB. Кроме того, было обнаружено, что это взаимодействие имеет относительно слабую (микромольную) аффинность (Mir et al., 2011), которая аналогична 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 в исследовании Mir et al. (2011), в котором использовалась только одна концентрация муропептида (Mir et al., 2011). Кроме того, моносахарид-олигопептиды были использованы 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.

В нашем исследовании относительно большие фрагменты ПГ способствуют реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Реактивационная активность была сходной для фрагментов, полученных как при гидролизе ПГ белком Rpf, так и при ультразвуковой обработке ПГ, что отражает независимость реактивации от способа получения фрагментов ПГ. Интересно, что смесь продуктов гидролиза ПГ из *B. subtilis*, полученных под действием мутанолизина, оказывали лучшее влияние на процесс прорастания спор, чем отдельные муропептиды (Shah et al., 2008). Мы предполагаем, что высокомолекулярные фрагменты ПГ могут напрямую взаимодействовать с сенсорным механизмом, чтобы вызвать или облегчить реактивацию клеток. Независимо от того, верно ли это предположение, будет интересно проверить, будут ли такие фрагменты эффективно связываться с молекулами PknB, индуцируя их активацию посредством димеризации (Barthe et al., 2010). Сообщалось, что отдельные муропептиды не вызывали такой структурной перестройки внеклеточного домена PrkC (Ruggiero et al., 2011).

Относительно большие фрагменты ПГ, полученные после обработки ультразвуком, могут служить субстратом для эндогенного Rpf, что может привести к образованию низкомолекулярных продуктов (муропептидов), которые, в свою очередь, активируют процесс реактивации клеток. Действительно, было показано, что внеклеточный Rpf присутствовал в ранней лог-фазе культур *M. smegmatis* (Shleeve et al., 2004). Ингибирование реактивации в присутствии фрагментов ПГ с высокой молекулярной массой и в присутствии ингибитора Rpf бензоил-2-нитрофенилтиоцианата согласуется с этой гипотезой. Существование оптимальной концентрации фрагментов ПГ для максимальной стимуляции реактивации (Рис. 96b) также указывает на вторую возможность, поскольку была обнаружена аналогичная концентрационная зависимость для стимулирующей рост активности белков Rpf как для *M. luteus*, так и для *M. tuberculosis* (Mukamolova et al., 2002a). Природа этой необычной зависимости не ясна. Было отмечено, что подобная зависимость характерна для некоторых взаимодействий гормон-рецептор и

лиганд-рецептор (Mukamolova et al., 2006). Это также можно объяснить ингибированием ферментативной активности избытком субстрата (Kuhl, 1994).

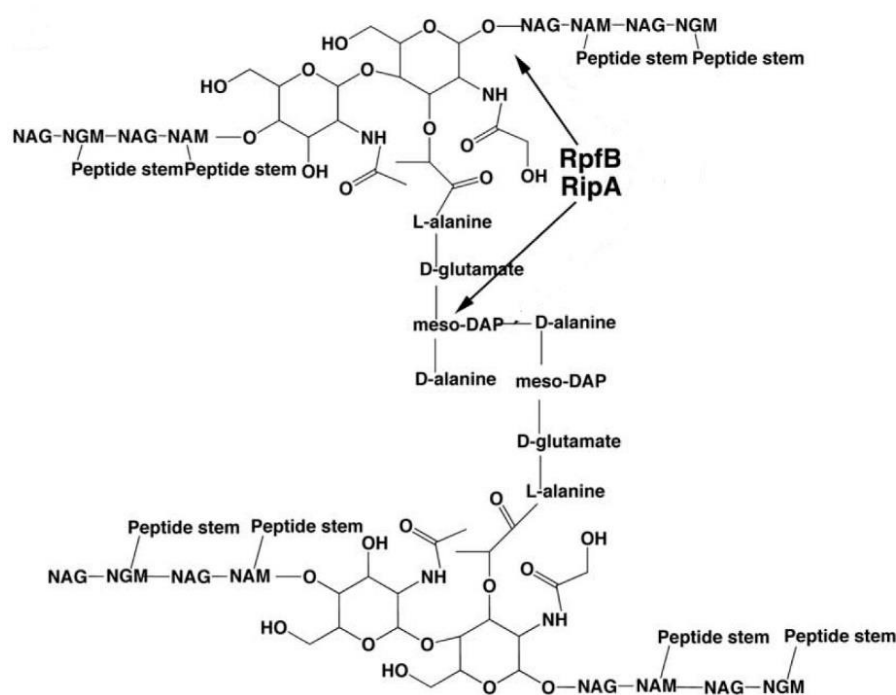
Мы обнаружили сдвиг максимума концентрации биологической активности фрагментов ПГ после диализа (Рис. 99а, б), который, вероятно, отражает вклад молекул с низкой молекулярной массой (<10 кДа) в общую активность фрагментов ПГ. Альтернативой является то, что реактивирующиеся клетки могут использовать фрагменты ПГ в качестве источника строительных блоков для синтеза ПГ (Mauck et al., 1971), когда синтез компонентов *de novo* может быть нарушен в стрессированных клетках.

Таким образом, гипотеза о стимулирующем реактивацию действии продуктов гидролиза Rpf находит подтверждение в нашей работе.

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

Модуляция биосинтеза и состава ПГ имеет решающее значение для нормального клеточного роста и деления, а также для поддержания покоя или осуществления процесса реактивации микобактерий. У *Mtb* Rpf-зависимое расщепление ПГ, по-видимому, важно для реактивации. Ранее было обнаружено, что RpfB действует не один, а в комплексе с другим внеклеточным ферментом, названным белком, взаимодействующим с фактором, стимулирующим реактивацию (RipA) (Hett et al., 2007, 2008; Ruggiero et al., 2010; Squeglia et al., 2014). RipA является белком, состоящим из 472 остатков, кодируемым геном *M. tuberculosis* rv1477, и был идентифицирован как партнер по связыванию с RpfB и RpfE. Делеция RipA-ортолога у *Msm* привела к дефектам при образовании септы во время клеточного деления (Hett et al., 2007). Обнаружено, что оба белка (RpfB и RipA) со-локализуются в перегородке делящихся клеток (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, способным расщеплять пептидные связи внутри пептидной цепи (гидролизует D-глутамил-мезо-диаминопимелиновую кислоту на изоглутамин (D-iGln) и мезодиаминопимеленовую кислоту (m-DAP)) – аминокислоты, которые являются частью поперечных сшивок необходимых для сохранения ригидности и стабильности пептидогликана (Hett et al., 2008; Squeglia et al., 2014) (Рис. 102). Взаимодействие между этими гидролазами клеточной стенки приводит к синергетическому гидролизу микобактериального ПГ (Hett et al., 2008).



(Hett et al., 2010)

Рис. 102. Гидролиз пептидогликана под действием RpfB и RipA.

Однако механизмы, лежащие в основе их кооперативной активности, остаются неясными, поскольку их взаимодействие может быть связано либо с аллостерической активацией одного из этих белков, либо с их повышенной способностью высвобождать свободные муропептиды, воздействуя как на гликан, так и на пептидные фрагменты.

ПГ покоящихся бактерий демонстрирует уникальные химические свойства как в полисахаридных цепях, так и в пептидных поперечных связях. Например, MurNAc часто заменяется N-гликолилмурамовой кислотой (замена N-ацетильной части N-гликолильным остатком), что приводит к увеличению числа водородных связей в слоях ПГ (Lavollay et al., 2008).

Мы выяснили, что происходит в результате гидролиза ПГ под совместным действием белков RpfB и RipA и как это отражается на последующей реактивации «некультивируемых» микобактерий.

Были проведены эксперименты по деградации ПГ в присутствии рекомбинантных каталитических доменов RpfBc (остатки 280–362) и RipAc (остатки 332–472) с целью выяснения механизма ранее наблюдавшегося синергетического гидролиза ПГ этими двумя ферментами. Это позволило нам исключить вклад некаталитических доменов в синергию деградации ПГ. Кроме того, структурные исследования RipA показали, что некаталитические домены ответственны за самоингибирование фермента как таковое посредством механизма регуляции, который включает протеолитическую активацию фермента (Ruggiero et al., 2010).

Эксперименты по деградации клеточной стенки проводили на очищенном ПГ из *Msm*, который был маркирован FITC (см. Методы). Оба рекомбинантных белка, RpfBc и RipAc, отдельно и в комбинации, были проинкубированы с меченым микобактериальным ПГ. Гидролизную 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 (результаты не показаны). Количество высвобождаемых продуктов зависело от концентрации белков, добавляемых в реакционную смесь (Рис. 103). Результаты ясно показали, что смесь RpfBc и RipAc дала самую высокую эффективность гидролиза ПГ.

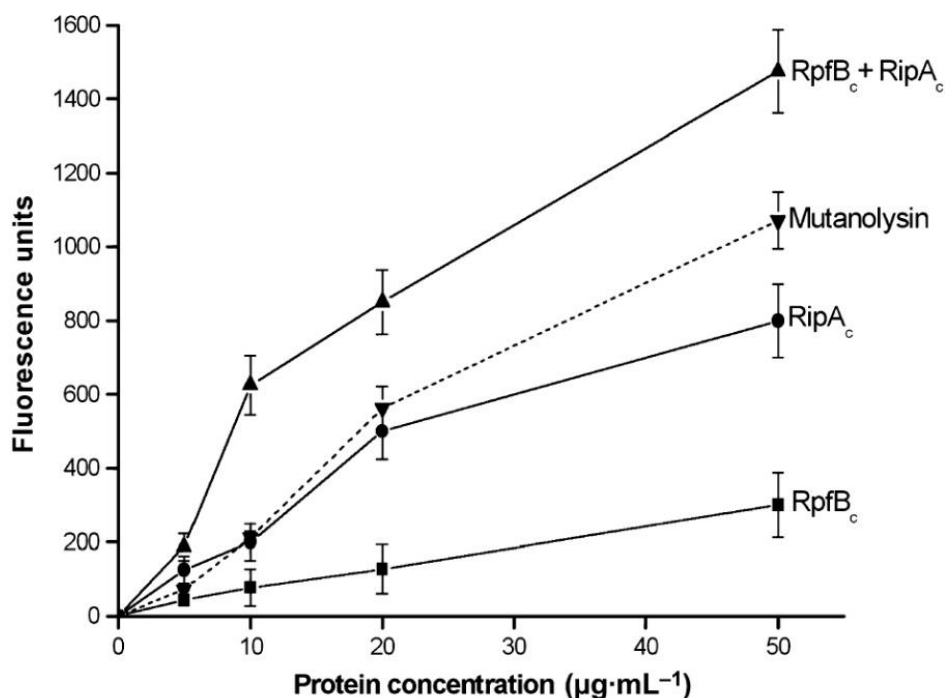


Рис. 103. Ферментативный гидролиз микобактериального ПГ. FITC-меченный ПГ из *Msm* растворяли в реакционном буфере (см. Методы). Рекombинантные RpfB_c и RipA_c добавляли к образцам в различных концентрациях и инкубировали в течение 96 ч при 37°C. Смесь содержала равные количества каждого белка (например, 20 мкг/мл каждого белка). Уровень гидролиза оценивали путем измерения несвязанного флуоресцентного красителя в супернатанте после центрифугирования (13 000 g, 10 мин). Для сравнения показана кривая гидролиза в присутствии мутанолизина. Каждая точка на графике представляет значение флуоресценции, скорректированное относительно контроля флуоресценции. Бары представляют стандартную ошибку среднего из трех повторений с похожими результатами. Типичный результат одного независимого эксперимента показан.

Было очевидно, что в любой точке концентрации (на оси абсцисс) сумма конкретного зависящего от гидролиза значения флуоресценции (значения единиц флуоресценции на оси ординат) любого белка (либо RpfB_c, либо RipA_c) была меньше, чем тот же эффект, производимый смесью обоих белков (RpfB_c + RipA_c) в той же концентрации (Рис. 103).

В отличие от результатов, опубликованных Hett с соавторами (Hett et al., 2008) нам удалось обнаружить гидролитическую активность RpfB из *M. tuberculosis* по отношению к ПГ из *M. smegmatis*. Однако уровень этой гидролитической активности был довольно низким, особенно по сравнению с ферментативной активностью RipA и смеси двух ферментов (Рис. 103). Мы заметили, что экспрессия рекомбинантного RpfB в относительно низких концентрациях из

продуцирующего штамма *E.coli* с максимальным временем индукции ~ 2 ч имеет решающее значение для достижения максимальной ферментативной активности и, следовательно, для эффективного гидролиза ПГ и для успешного проведения экспериментов по реактивации. Этот методологический подход предполагает, что рекомбинантный RpfВ должен быть получен при исходных концентрациях <200 мкг/мл. Экспрессия белка в более высоких концентрациях приводит к агрегации и последующей потере активности (Рис. 104).

Чтобы идентифицировать продукт синергетического расщепления ПГ, мы использовали MALDI-TOF масс-спектрометрию (МС). МС анализ отфильтрованных гидролизатов ПГ (фильтр с размером пор 3 кДа) из различных параллельных экспериментов выявил наличие пика m/z 716,6 (Рис. 105а). Чтобы определить химическую природу этого продукта, мы получили спектры фрагментации (МС/МС). Анализ паттерна фрагментации позволил нам идентифицировать продукт гидролиза ПГ в присутствии обоих белков, который оказался N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат (ангидроGMDP) (Рис. 105в). Характер фрагментации идентифицированного продукта соответствовал (Рис. 105в, вверху) паттерну фрагментации синтезированного продукта (Рис. 105в, 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. Тот же анализ супернатантов, полученных из образцов ПГ, которые не подвергались воздействию ферментов, показал отсутствие выявленных продуктов гидролиза ПГ. Это подтвердило гипотезу о том, что высвобождение муропептидов в супернатант происходит в результате совместного ферментативного действия двух белков.

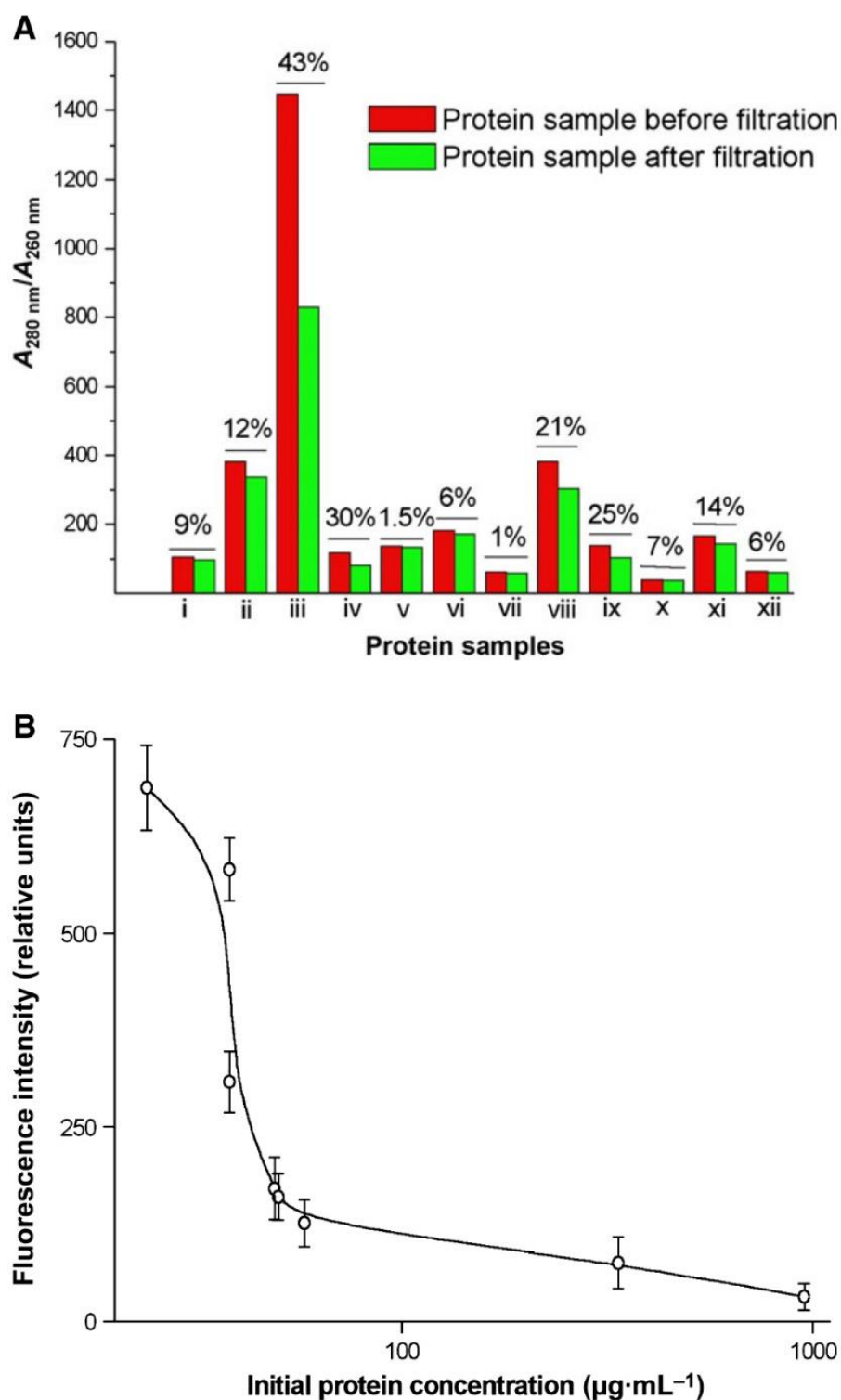


Рис. 104. Экспрессия белка RpfB в высоких концентрациях приводит к его агрегации и последующей потере его активности. (A) Концентрированные образцы RpfB содержат большое количество агрегатов. Столбцы представляют разные образцы (12) разных концентраций рекомбинантного RpfB. Белки пропускали через фильтры с размером пор 0,2 мкм и сравнивали концентрации белка до и после фильтрации. Понятно, что более концентрированные образцы содержали значительные количества крупных агрегатов. Числа над столбиками указывают на потерю белка (% от начальной концентрации). (B) Концентрированный RpfB менее активен. Эксперименты проводились на искусственном субстрате для Rpf, MUF-3-NAG. Равные аликвоты белков (15 мкг / мл) добавляли к MUF-3-NAG. Начальная концентрация белка показана на оси X.

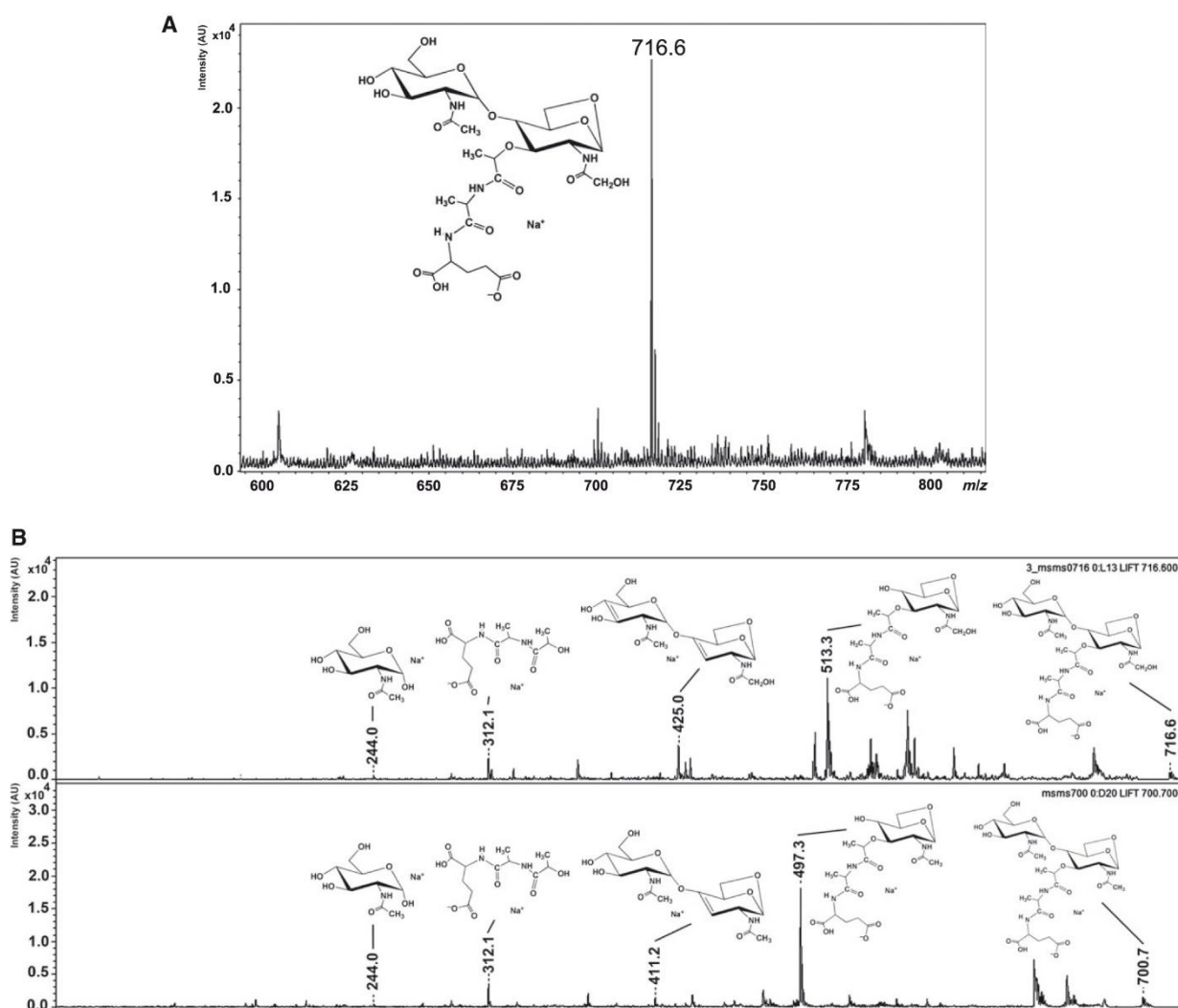


Рис.105. (A) МС спектры (MALDI) супернатанта, отфильтрованного через 3-кДа фильтр, полученный после гидролиза микобактериального ПГ (из *Msm*) в присутствии RpfBc + RipAc (оба по 10 мкг/мл). (B) Спектры фрагментации пиков МС, m/z 716,6 и m/z 700,7. Вверху: фрагментация пика (m/z 716,6), появляющегося при совместном расщеплении ПГ RpfBc и RipAc [N-ацетилглюкозаминил- β (1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-1,6-ангидромураоил-L-аланил-D-изоглутамат]. Внизу: фрагментация пика для синтетического аналога ангидроGMDP (m/z 700,7). Паттерн фрагментации идентифицированного продукта совпадает с паттерном фрагментации синтезированного продукта. В обоих случаях могут быть обнаружены фрагменты со следующими соотношениями m/z : GlcNAc 244; дипептид 312; дисахаридные фрагменты 411 и 425; андосахарид-дипептид 513,3 и 497,3. Наблюдаемые различия в массе исходных соединений могут быть объяснены тем фактом, что природный ПГ из микобактерий состоит из большого количества гликолил-модифицированных фрагментов муравовой кислоты.

Было проведено исследование влияния совместного действия белков RpfB и RipA на реактивацию покоящихся «некультивируемых» микобактерий. Оценку эффективности реактивации проводили путем подсчета появляющихся культивируемых микобактерий (увеличение КОЕ) во время инкубации «некультивируемых» клеток в свежей жидкой среде. 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 либо отдельного белка (RpfBc или RipAc), либо их смеси в среду роста значительно стимулировало реактивацию и рост изначально покоящихся бактерий (RipAc был более эффективен, чем RpfBc; $P < 0,05$) (Рис. 106а). В этом эксперименте отдельные ферменты добавляли в количестве 10 нг/мл, концентрация, которая была экспериментально определена по кривой доза-ответ, полученной при следующих концентрациях: 1, 5, 10, 20 и 50 нг/мл (Рис. 106в). 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 наблюдаемая синергия в экспериментах по деградации ПГ (Рис. 103) также наблюдалась и в случае реактивации (Рис. 106а). Стоит отметить, что этот результат также является первым экспериментальным подтверждением участия RipA в реактивации микобактерий.

Чтобы определить, была ли реактивация непосредственно стимулирована белками или продуктами их действия, мы сначала протестировали смесь продуктов ферментативного гидролиза ПГ, профильтрованных через фильтр с размером пор 3 кДа. Этот образец (100 мкг/мл) обладал стимулирующей реактивацию активностью, аналогичную наблюдаемой для очищенных белков (данные не показаны), что указывает на наличие физиологически активного низкомолекулярного соединения в смеси. Затем мы протестировали синтетический аналог муропептида (ангидроГМДП), который был обнаружен в этой смеси. Как и в экспериментах по реактивации покоящихся микобактерий в присутствии белков (Рис. 106а), мы обнаружили, что добавление синтетического ангидроГМДП к покоящимся бактериям приводило к размножению первоначально «некультивируемых» клеток (Рис. 107).

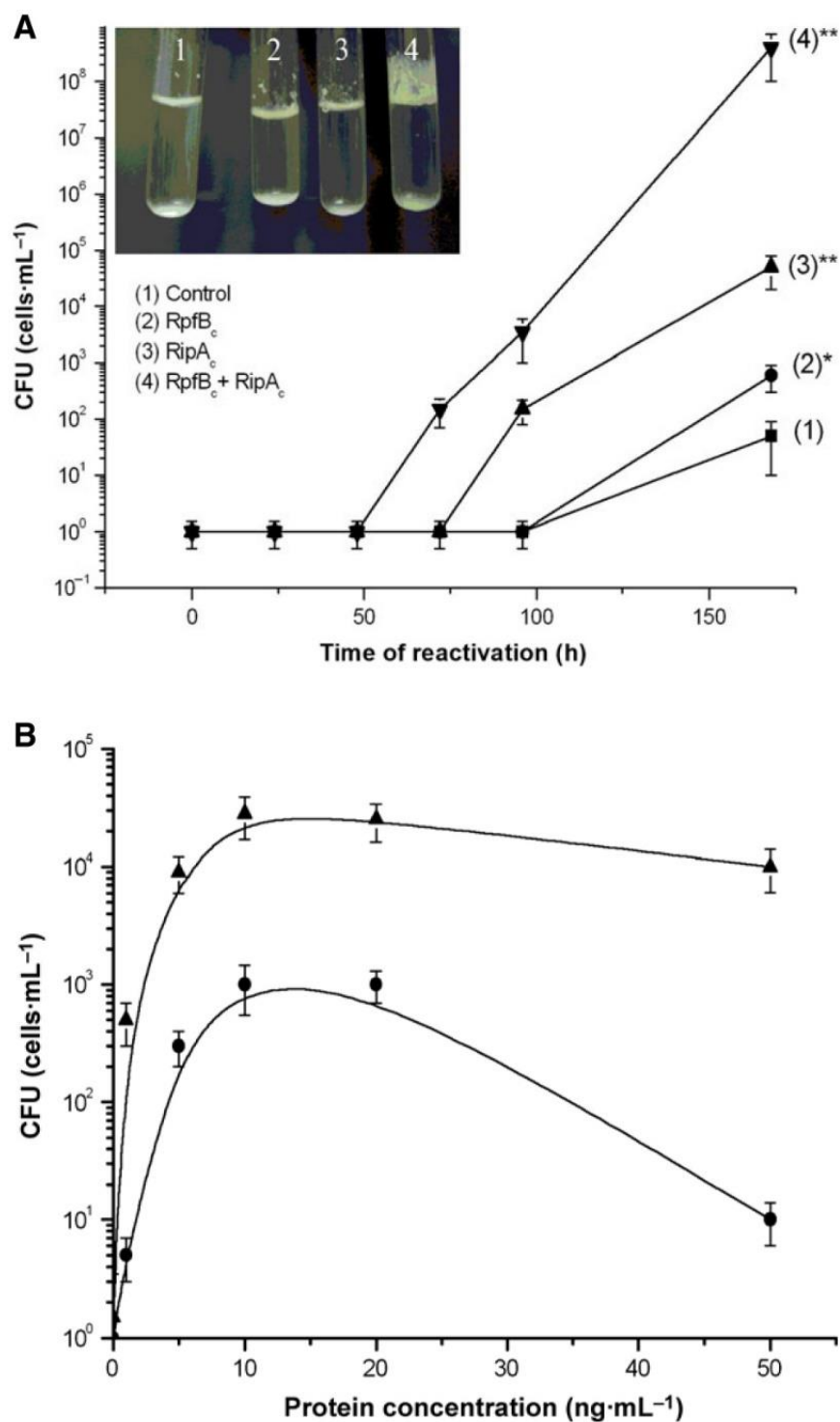


Рис. 106. Реактивация покоящихся «некультивируемых» клеток *Mycobacterium smegmatis* в присутствии белков RpfB_c и RipA_c, как отдельно, так и в комбинации. «Некультивируемые» клетки (ОП600 нм = 0,3) инокулировали в среду для реактивации и вносили RpfB_c и RipA_c, отдельно и в комбинации, инкубировали с перемешиванием при 37°C. (А) Периодически образцы отбирались для подсчета КОЕ. ■ контроль; ●, RpfB_c, 10 нг/мл, * P < 0,05 по сравнению с контролем через 160 ч; ▲, RipA_c, 10 нг/мл, ** P < 0,01 по сравнению с RpfB_c через 160 часов; ▼, RpfB_c / RipA_c 10/10 нг/мл, ** P < 0,01 по сравнению с RpfB_c + RipA_c через 160 часов. Вставка: пробирки с реактивированной культурой *M. smegmatis* после 160 ч реактивации. (В) Концентрационная зависимость эффекта реактивации после 160 ч инкубации: ▲, RipA_c; ●, RpfB_c. Бары представляют среднее отклонение (три повторения для каждой временной точки или концентрации белка).

Примечательно, что зависимость степени реактивации от концентрации ангидроГМДП продемонстрировала тенденцию в форме колокола с широким диапазоном стимулирующей реактивации активности от 9 до 225 нг/мл и максимальной активностью в диапазоне 40-100 нг/мл (Рис. 107, врезка).

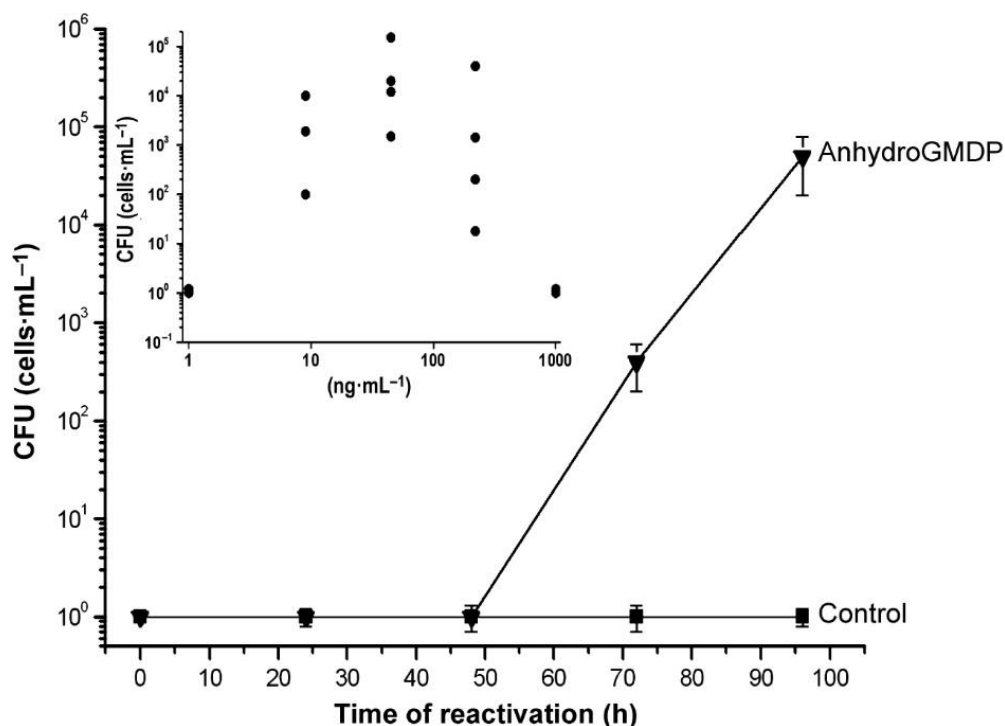


Рис. 107. ангидроГМДП стимулирует реактивацию «некультивируемых» клеток *Mycobacterium smegmatis*. Концентрация ангидроГМДП составляла 225 нг/мл. Бары представляют стандартную ошибку среднего (три повторения для каждой временной точки). Типичный результат одного независимого эксперимента показан. Вставка: концентрационная зависимость. Показано число КОЕ (относительная погрешность <30%) в конце реактивации (96 ч) в зависимости от концентрации ангидроГМДП. Каждая точка представляет результат одного независимого эксперимента.

Следует отметить, что применение ряда других муропептидов или их фрагментов, включая моносахарид-дипептид (MurNAc-L Ala-D-isoGlu), 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 точная химическая природа муропептидов, образующихся при совместном действии RpfBc и RipAc, является важной молекулярной детерминантой в процессе реактивации покоящихся микобактерий.

Модуляция биосинтеза и состава ПГ имеет решающее значение для нормального клеточного роста и деления, а также для поддержания покоя или осуществления реактивации микобактерий. У *Mtb* Rpf-зависимое расщепление ПГ, по-видимому, важно для реактивации (Kana and Mizrahi, 2010). Роль RipA в реактивации покоящихся микобактерий ранее не была установлена. В нашей работе был изучен RpfB/RipA-зависимый процесс деградации ПГ и его связь с реактивацией микобактерий из состояния покоя. Было показано, что RipA действительно участвует в процессе реактивации покоящихся микобактерий, помимо его известной роли в делении клеток. Кроме того, мы наблюдали корреляцию между синергией RpfB и RipA в деградации ПГ и в реактивации покоящихся микобактерий.

Анализ химической природы продуктов, образующихся в результате гидролиза ПГ в присутствии ферментов RpfB и RipA, прояснил молекулярный механизм этой реакции. Несмотря на существование нескольких структурных исследований в отношении RpfB (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Ruggiero et al., 2009), информация о его механизме действия все еще отсутствует. Каталитический домен RpfB демонстрирует структурное сходство с лизоцимом, механизм действия которого хорошо изучен (Ruggiero et al., 2013; Vocadlo et al., 2001). В молекуле лизоцима два остатка аминокислот (Glu35 и Asp52) являются критическими для ферментативной активности: Glu35 действует как донор протонов для гликозидной связи, а Asp52 действует как нуклеофил. В отличие от лизоцима RpfB не имеет остатка, эквивалентного Asp52 в лизоцимах с-типа; одиночный экстракислотный остаток в субстрат-связывающей щели Rpf — это Asp312, который, в свою очередь, существует только в RpfB. В связи с этим мы делаем вывод, что RpfB действует через механизм, напоминающий механизм литической трансгликозилазы, а не лизоцима. Действительно, мы определили продукт совместного действия RpfB и RipA, который оказался ангидроГМДП и является аналогичным продукту литического действия трансгликозилазы (Hoeltje et al., 1975). Этот муропептид был способен стимулировать реактивацию «некультивируемых»

бактериальных клеток, аналогично RpfB или RipA (Рис. 106 и 107). При этом концентрационная зависимость его реактационной активности оказалась колоколообразной, как для концентраций стимулирующей активности белков Rpf *in vitro* (Mukamolova et al., 2002a) и для реактационной активности крупных фрагментов ПГ в отношении «некультивируемых» форм *M. smegmatis*. Природа этой колоколообразной зависимости остается неясной, хотя это может быть теоретически объяснено вероятным торможением нижестоящих процессов в пути реактационной активности из-за наличия избытка субстрата.

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

3.3.8. Гипотетическая схема реактационной активности покоящихся микобактерий.

Обобщая полученные данные относительно процессов, происходящих при реактационной активности покоящихся микобактерий, мы предлагаем следующую гипотетическую схему процесса реактационной активности (Рис. 108). Имеется три этапа реактационной активности (Рис. 77). На первом этапе не происходит биосинтетических процессов. Все процессы на этом этапе связаны с катаболическими реакциями. В частности, активируется трегалаза, гидролизующая трегалозу, высвобождается глюкоза и повышается уровень АТФ (скорее всего за счет анаэробного гликолиза) и, возможно, других метаболитов. На втором этапе активируется аденилатциклаза и повышается уровень цАМФ в клетке. Обладая плеiotропным эффектом цАМФ может активировать значительное число реакций, которые в итоге приводят к началу синтеза макромолекул, активации общего метаболизма (3-й этап).

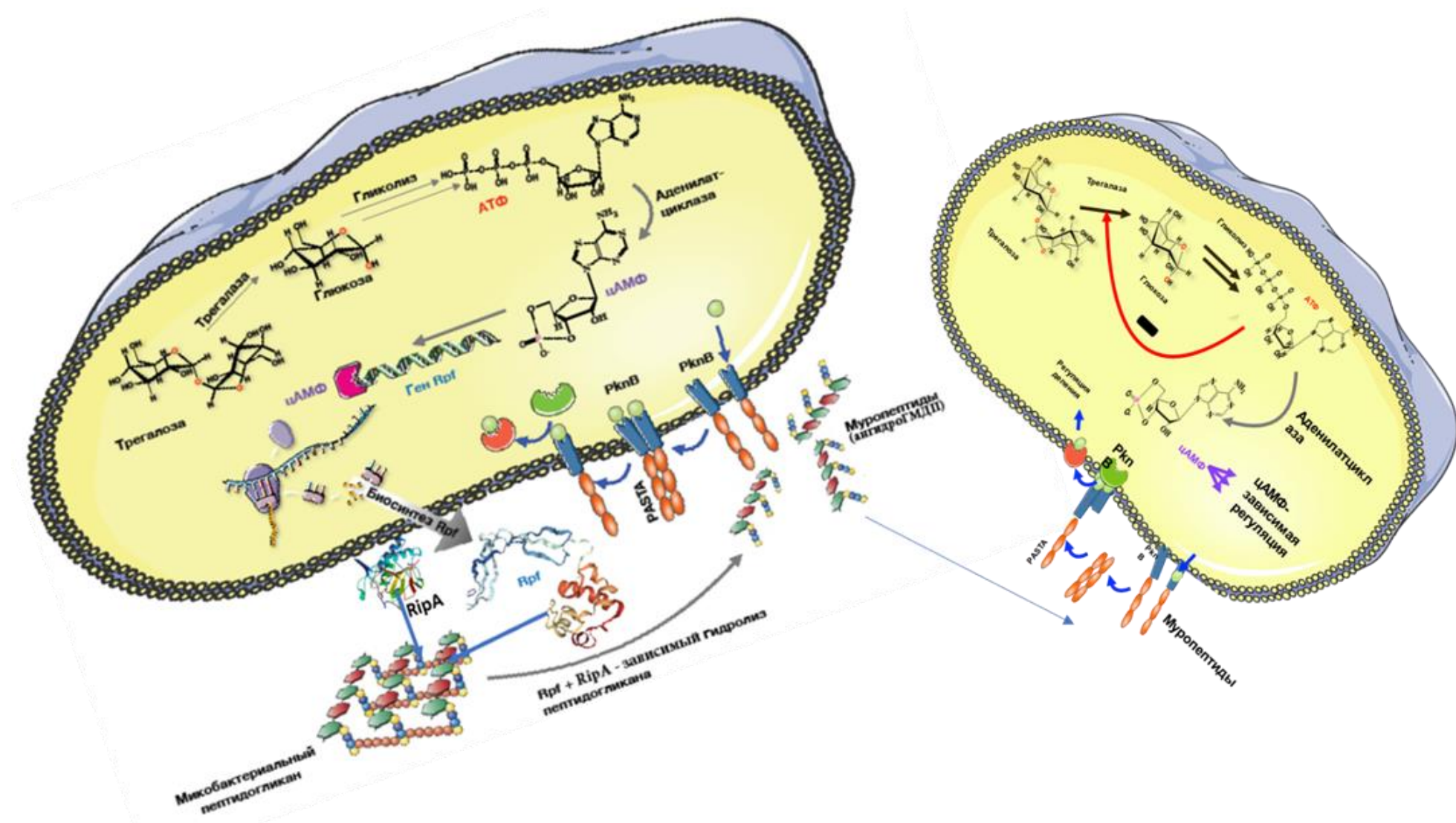


Рис. 108. Гипотетическая схема реактивации покоящихся микобактерий.

Одним из следствий повышения цАМФ является активация цАМФ-ТФ, который стимулирует экспрессию 150 генов, в том числе *rpfA* и синтез белка RpfA. Rpf, как литическая трансглюкозилаза, может приводить к ремоделингу клеточной стенки совместно с белком RipA и в конечном итоге к делению клеток. С другой стороны, в результате Rpf/RipA-зависимого процесса деградации пептидогликана образуются секретируемые 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 хранятся в покоящихся клетках для дальнейшей реактивации клеток в случае наступления благоприятных условий; 3) белки, которые являются функциональными и могут играть роль в поддержании клеточного метаболизма на 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 I 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.

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. 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. Повышенная концентрация продукции цАМФ вследствие активации АЦ Rv2212 увеличивает продукцию RpfA 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. Полученные в ходе работ результаты позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Постепенное закисление окружающей среды (рН 8 → 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S., and Bishai, W. R. (2009). Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. *Nature* 460, 98–102.
2. Agarwal, S., Tiwari, P., Deep, A., Kidwai, S., GuptaKrishan, S., Thakur, G., et al. (2018). System-Wide Analysis Unravels the Differential Regulation and *In Vivo* Essentiality of Virulence-Associated Proteins B and C Toxin-Antitoxin Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 217, 1809–1820.
3. Ahearn, J., and Fearon, D. (1989). Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol.* 46, 183–219.
4. Ahidjo, B. A., Kuhnert, D., McKenzie, J. L., Machowski, E. E., Gordhan, B. G., Arcus, V., et al. (2011). VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate vapB antitoxins. *PLoS One* 6 (6), e21738.
5. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996). An Escherichia coli chromosomal “addiction module” regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6059–6063.
6. Akif, M., Khare, G., Tyagi, A. K., Mande, S. C., and Sardesai, A. A. (2008). Functional Studies of Multiple Thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190, 7087–7095.
7. Albeldas, C., Ganief, N., Calder, B., Nakedi, K. C., Garnett, S., Nel, A. J. M., et

- al. (2018). Global proteome and phosphoproteome dynamics indicate novel mechanisms of vitamin C induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Proteomics* 180, 1–10.
8. Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S. R., Højrup, P., Pham, T. V., Weldingh, K., et al. (2013). Proteomic Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin–antitoxin systems. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 1180–1191.
9. Anand, P. K., and Kaul, D. (2003). Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription Paras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 876–877.
10. Ang, K., Ibrahim, P., Gam, L., and Sciences, P. (2014). Analysis of differentially expressed proteins in late-stationary growth phase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61, 153–64.
11. Antonova, N. A., Osipova, V. P., Kolyada, M. N., Movchan, N. O., Milaeva, E. R., and Pimenov, Y. T. (2010). Study of the antioxidant properties of porphyrins and their complexes with metals. *Macroheterocycles* 3, 139–144.
12. Anuchin, A. M., Goncharenko, A. V., Demina, G. R., Mulyukin, A. L., Ostrovsky, D. N., and Kaprelyants, A. S. (2010). The role of histone-like protein, Hlp, in *Mycobacterium smegmatis* dormancy. *FEMS Microbiol. Lett.* 308, 101–107.
13. Arguelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174, 217–224.
14. Atrih, A., and Foster, S. J. (1999). The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 299–307.
15. Aulet, O., Silva, C., Fraga, S. G., Pichel, M., Cangemi, R., Gaudio, C., et al. (2007). Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 385–390.
16. Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., and Kornberg, A. (1998). Novel

- assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 1841–1847.
17. Bai, G., Knapp, G. S., and McDonough, K. A. (2011). Cyclic AMP signaling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency. *Cell Microbiol.* 13, 349–358.
 18. Bai, G., Mccue, L. A., and McDonough, K. A. (2005). Characterization of Mycobacterium tuberculosis Rv3676 (CRP Mt), a Cyclic AMP Receptor Protein-Like DNA Binding Protein. *J. Bacteriol.* 187, 7795–7804.
 19. Bai, G., Schaak, D. D., and McDonough, K. A. (2009). cAMP levels within Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG increase upon infection of macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 55, 68–73.
 20. Baker, D. A., and Kelly, J. M. (2004). Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol. Microbiol.* 52, 1229–1242.
 21. Bakken, L. R., and Olsen, R. A. (1987). The relationship beA cell size and viability of soil bacteria. *Microb. Ecol.* 13, 103–114.
 22. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (80-.)*. 305, 1622–1625.
 23. Banaiee, N., Jacobs, W. R., and Ernst, J. D. (2006). Regulation of Mycobacterium tuberculosis whiB3 in the mouse lung and macrophages. *Infect. Immun.* 74, 6449–6457.
 24. Barer, M. R. (1997). Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer? *J. Med. Microbiol.* 46, 629–631.
 25. Barer, M. R., and Harwood, C. R. (1999). Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb. Physiol.* 41, 93–137.
 26. Barer, M. R., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., and Kell, D. B. (1998). Microbial stress and culturability: conceptual and operational domains. *Microbiology* 144, 2009–2010.
 27. Bartek, I., Rutherford, R., Gruppo, V., Morton, R., Morris, R., Klein, M., et al. (2009). The DosR regulon of M. tuberculosis and antibacterial tolerance.

28. Barthe, P., Mukamolova, G. V, Roumestand, C., and Cohen-Gonsaud, M. (2010). The Structure of PknB Extracellular PASTA Domain from *Mycobacterium tuberculosis* Suggests a Ligand-Dependent Kinase Activation. *Structure* 18, 606–615.
29. Barthelmebs, L., Lecomte, B., Divies, C., and Cavin, J. F. (2000). Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 182, 6724–6731.
30. Berney, M., and Cook, G. M. (2010). Unique flexibility in energy metabolism allows mycobacteria to combat starvation and hypoxia. *PLoS One* 5 (1), e8614.
31. Betts, J. C., Lukey, P. T., Robb, L. C., Mcadam, R. A., and Duncan, K. (2002). Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* 43, 717–731.
32. Bhat SA, Singh N, Trivedi A, Kansal P, Gupta P, Kumar A. (2012). The mechanism of redox sensing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Free Radic Biol Med.* 53(8):1625–1641. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.008
33. Bigger, J. W. (1944). Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. *J. Chem. Inf. Model.* 244, 497–500.
34. Biketov, S., Mukamolova, G. V., Potapov, V., Gilenkov, E., Vostroknutova, G., Kell, D. B., et al. (2000). Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: A bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 233–240.
35. Billig, S., Schneefeld, M., Huber, C., Grassl, G. A., Eisenreich, W., and Bange, F. C. (2017). Lactate oxidation facilitates growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Sci. Rep.* 7, 1–12.
36. Bishai, W. (2000). Lipid lunch for persistent pathogen. *Nature* 406, 683–685.
37. Bisset, K. A. (1950). Evolution in bacteria and the significance of the bacterial

spore. *Nature* 166, 431–432.

38. Bligh, E. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
39. Bode, G., Mauch, F., and Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 111, 483–490.
40. Boon, C., Li, R., and Qi, R. (2001). Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J. Bacteriol.* 183, 2672–2676.
41. Brooks, J. V., Furney, S. K., and Orme, I. M. (1999). Metronidazole therapy in mice infected with tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1285–1288.
42. Bryk, R., Gold, B., Venugopal, A., Singh, J., Samy, R., Pupek, K., et al. (2008). Selective Killing of Nonreplicating Mycobacteria Krzysztof. *Cell Host Microbe* 3, 137–145.
43. Buchmeier, N. A., Newton, G. L., Koledin, T., and Fahey, R. C. (2003). Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Mol. Microbiol.* 47, 1723–1732.
44. Calcott, P. H., and Postgate, J. R. (1972). On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 70, 115–122.
45. Carroll, J. D., Pastuszak, I., Edavana, V. K., Pan, Y. T., and Elbein, A. D. (2007). A novel trehalase from *Mycobacterium smegmatis* - Purification, properties, requirements. *FEBS J.* 274, 1701–1714.
46. Carroll, M. W., Jeon, D., Mountz, J. M., Lee, J. D., Jeong, Y. J., Zia, N., et al. (2013). Efficacy and safety of metronidazole for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3903–3909.
47. Carson, D. D., and Daneo-moore, L. (1980). Effects of Fatty Acids on Lysis of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 141, 1122–1126.
48. Caruso, A. M., Serbina, N., Klein, E., Bloom, B. R., Flynn, J. L., Caruso, A. M., et al. (2019). Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished

- Levels of IFN- γ , Yet Succumb to Tuberculosis. *J Immunol* 1999; 162, 5407–5416.
49. Casonato, S., Sánchez, A. C., Haruki, H., González, M. R., Provvedi, R., Dainese, E., et al. (2012). WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence and reactivation. *Infect. Immun.* 80, 3132–3144.
 50. Castello, P., Drechsel, D. A., Day, B. J., and Patel, M. (2008). Inhibition of mitochondrial hydrogen peroxide production by lipophilic metalloporphyrins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 970–976.
 51. Cellini, L., Marzio, L., Allocati, N., Dainelli, B., Lezzi, T., Angelucci, D., et al. (1994). Cocoid *Helicobacter pylori* Not Culturable In Vitro Reverts in Mice. *Microbiol. Immunol.* 38, 843–850.
 52. Chan, J., Fan, X., Hunter, S. W., Brennan, P. J., and Bloom, B. R. (1991). Lipoarabinomannan, a Possible Virulence Factor Involved in Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages. *Infect. IMMUNITY*, 59, 1755–1761.
 53. Chan, J., Tanaka, K., Carroll, D., and Flynn, J. (1995). Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Murine Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 736–740.
 54. Chao, M. C., and Rubin, E. J. (2010). Letting Sleeping dos Lie : Does Dormancy Play a Role in Tuberculosis ? *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 293–311.
 55. Chatterjee, D., Hunter, S., McNeil, M., and Brennan, P. (1992). Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem.* 267, 6228–33.
 56. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., et al. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* 7, 12807.
 57. Choi, M. Y., Wang, Y., Wong, L. L. Y., Lu, B. tai, Chen, W. yang, Huang, J. D., et al. (2012). The two PPX-GppA homologues from *Mycobacterium tuberculosis* have distinct biochemical activities. *PLoS One* 7 (8), e42561.

58. Chuang, Y.-M., Belchis, D. A., and Karakousis, P. C. (2013). The Polyphosphate Kinase Gene *ppk2* Is Required for *Mycobacterium*. *Am. Soc. Microbiol.* 4, 1–9.
59. Clemens, D. L., Lee, B., and Horwitz, M. A. (2000). Deviant Expression of Rab5 on Phagosomes Containing the Intracellular Pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* Is Associated with Altered Phagosomal Fate. *Infect. Immun.* 68, 2671–2684.
60. Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagn  ris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., et al. (2005). The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 270–273.
61. Colangeli, R., Arcus, V. L., Cursons, R. T., Ruthe, A., Karalus, N., Coley, K., et al. (2014). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans. *PLoS One* 9, 1–9.
62. Colangeli, R., Haq, A., Arcus, V. L., Summers, E., Magliozzo, R. S., McBride, A., et al. (2009). The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4414–4418.
63. Connell, N. D. (1994). Chapter 6: *Mycobacterium*: Isolation, Maintenance, Transformation, and Mutant Selection. *Methods Cell Biol.* 45, 107–125.
64. Cox, J. S., Chen, B., Mcneil, M., and Jacobs, W. R. (1999). Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79–83.
65. Cundliffe, E. (1989). How Antibiotic-Producing Organism Avoid Suicide. *Annu. Rev. Genet.* 43, 207–233.
66. Cunningham, A. F., Ashton, P. R., Spreadbury, C. L., Lammas, D. A., Craddock, R., Wharton, C. W., et al. (2004). Tubercle bacilli generate a novel cell wall-associated pigment after long-term anaerobic culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 191–198.

67. Cunningham, A. F., and Spreadbury, C. L. (1998). Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 180, 801–8.
68. Currás, M., Magariños, B., Toranzo, A. E., and Romalde, J. L. (2002). Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis. Aquat. Organ.* 52, 129–136.
69. Daffe, M., and Draper, P. (1997). *The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. ADVANCES IN MICROBIAL PHYSIOLOGY.* 1998;39:131-203.
70. Dahl, J. L., Kraus, C. N., Boshoff, H. I. M., Doan, B., Foley, K., Avarbock, D., et al. (2003). The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10026–10031.
71. Daley, C., Small, P., Schechter, G., Schoolnik, G., McAdam, R., Jacobs, W. J., et al. (1992). An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med.* 326, 231–235.
72. Daniel, J., Deb, C., Dubey, V. S., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Morbidoni, H. R., et al. (2004). Induction of a Novel Class of Diacylglycerol Acyltransferases and Triacylglycerol Accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as It Goes into a Dormancy-Like State in Culture. *J. Bacteriol.* 186, 5017–5030.
73. Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., and Kolattukudy, P. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog.* 7, e1002093.
74. Dayaram, Y. K., Talaue, M. T., Connell, N. D., and Venketaraman, V. (2006). Characterization of a glutathione metabolic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance to glutathione and nitrosoglutathione. *J. Bacteriol.* 188, 1364–1372.
75. de Man, J. C. (1974). The probability of most probable numbers. *Eur. J. Appl.*

76. Deb, C., Lee, C., Dubey, V. S., Daniel, J., Abomoelak, B., Tatiana, D., et al. (2009). A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for *Mycobacterium tuberculosis* Generates a Lipid-Loaded , Drug-Tolerant , Dormant Pathogen. *PLoS One*. 4, e6077.
77. Deretic, V., and Fratti, R. A. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol.* 31, 1603–1609.
78. Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., et al. (2004). Deletion of a Cyclic AMP Receptor Protein Homologue Diminishes Germination and Affects Morphological Development of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 186, 1893–1897.
79. Desbois, A. P., and Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629–1642.
80. Desjardin, L. E., Hayes, L. G., Sohaskey, C. D., Wayne, L. G., and Eisenach, K. D. (2001). Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 183, 5311–5316.
81. Devergne, O., Emilie, D., Peuchmaur, M., Crevon, M., D’Agay, M., and Galanaud, P. (1992). Production of cytokines in sarcoid lymph nodes: preferential expression of interleukin-1 beta and interferon-gamma genes. *Hum Pathol* 23, 317–323.
82. Dhillon, J., Lowrie, D. B., and Mitchison, D. A. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* from chronic murine infections that grows in liquid but not on solid medium. *BMC Infect. Dis.* 4, 4–7.
83. Downward, J., and Toal, D. (1995). Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 16, 171–175.
84. Drancourt, M., and Raoult, D. (2007). Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1 (2), e83.

85. Dubos, R. J., and Davis, B. D. (1946). Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. *J Exp Med.* 83, 409–423.
86. Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., and Nyström, T. (2000). Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5746–5749.
87. Dukan, S., and Nyström, T. (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 274, 26027–26032.
88. Dussurget, O., Stewart, G., Neyrolles, O., Pescher, P., Young, D., and Marchal, G. (2001). Role of *Mycobacterium tuberculosis* Copper-Zinc Superoxide Dismutase. *Infect. Immun.* 69, 529–533.
89. Dworkin, J., and Shah, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nat Rev Microbiol.* 8, 890–896.
90. Ehlers, S. Lazy, Dynamic or Minimally Recrudescent? On the Elusive Nature and Location of the Mycobacterium Responsible for Latent Tuberculosis. *Infection* 37, 87 (2009). <https://doi.org/10.1007/s15010-009-8450-7>
91. Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17R–27R.
92. Ernst, J. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66, 1277–1281.
93. Eruslanov, E. B., Majorov, K. B., Orlova, M. O., Mischenko, V. V., Kondratieva, T. K., Apt, A. S., et al. (2004). Lung cell responses to *M. tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. *Clin. Exp. Immunol.* 135, 19–28.
94. Farewell, A., Kvint, K., and Nyström, T. (1998). Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol. Microbiol.* 29, 1039–1051.
95. Feese E, Ghiladi RA (2009) Highly efficient in vitro photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 64:782–785

96. Feng, L., Chen, S., and Hu, Y. (2018). PhoPR positively regulates *whiB3* expression in response to low pH in pathogenic mycobacteria. *J. Bacteriol.* 200, 1–11.
97. Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., and Pieters, J. (1999). A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of Mycobacteria. *Cell* 97, 435–447.
98. Ferreira, A., O’Byrne, C. P., and Boor, K. J. (2001). Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4454–4457.
99. Fisher, M. A., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. (2002). Microarray Analysis of the Mycobacterium tuberculosis Transcriptional Response to the Acidic Conditions Found in Phagosomes. *J. Bacteriol.* 184, 4025–4032.
100. Florczyk, M. A., McCue, L. A., Stack, R. F., Hauer, C. R., and McDonough, K. A. (2001). Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding proteins. *Infect. Immun.* 69, 5777–5785.
101. Flores, R. (1978). A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue. *Anal. Biochem.* 88, 605–611.
102. Flynn, B. J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., and Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 178, 2249–54.
103. Flynn, J. L., and Chan, J. (2001). IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS JoAnne. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 93–129.
104. Ford, C., Lin, P., Chase, M., Shah, R., Iartchouk, O., Galagan, J., et al. (2011). Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet.* 43, 482–486.
105. Francisco, S. (1998). A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*. 95, 4853–4858.

106. Frees, D., Gerth, U., and Ingmer, H. (2014). Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 142–149.
107. Fuhrhop, J. -H (1974). The reactivity of the porphyrin ligand. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 13, 321–335.
108. Galamba, A., Soetaert, K., Buyssens, P., Monnaie, D., Jacobs, P., and Content, J. (2001). Molecular and biochemical characterisation of *Mycobacterium smegmatis* alcohol dehydrogenase C. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 51–56.
109. Ganaie, A. A., Trivedi, G., Kaur, A., Jha, S. S., Anand, S., Rana, V., et al. (2016). Interaction of Erp protein of *Mycobacterium tuberculosis* with Rv2212 enhances intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 198, 2841–2852.
110. Ganesan, B., Stuart, M. R., and Weimer, B. C. (2007). Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2498–2512.
111. García, A. E., Blanco, C. F., Bigi, M. M., Vazquez, L. C., Forrellad, A. M., Rocha, R., et al. (2018). Characterization of the two component regulatory system PhoPR in *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 222, 30–38.
112. Garton, N. J., Christensen, H., Minnikin, D. E., Adegbola, R. A., and Barer, M. R. (2002). Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria *in vitro* and in sputum. *Microbiology* 148, 2951–2958.
113. Gatfield, J., and Pieters, J. (2000). Essential Role for Cholesterol in sion of phagosomes with lysosomes (4). sion of phagosomes with lysosomes (4). TACO lacks a putative transmembrane do- TACO lacks a putative transmembrane do- Entry of Mycobacteria into main, which suggests that it is a pe. *Science* (80-.). 288, 1647–1650.
114. Gazdik, M. A., and McDonough, K. A. (2005). Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. *J. Bacteriol.* 187, 2681–2692.
115. Gerdes, K., Christensen, S. K., and Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic

- toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371–382.
116. Gerdes, K., Gulyaev, A. P., Franch, T., and Mikkelsen, N. D. (1997). Antisense rna-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* 3, 1–31.
117. Giebel, J. D., Carr, K. A., Anderson, E. C., and Hanna, P. C. (2009). The germination-specific lytic enzymes SleB, CwlJ1, and CwlJ2 each contribute to *Bacillus anthracis* spore germination and virulence. *J. Bacteriol.* 191, 5569–5576.
118. Glickman, M. S., Cox, J. S., and Jacobs, W. R. (2000). A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording , Persistence , and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* 5, 717–727.
119. Glickman, M. S., and Jacobs, W. R. (2001). Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. *Cell* 104, 477–485.
120. Gordon, A., Hart, P., and Young, M. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79–80.
121. Goren, M. (1977). Phagocyte lysosomes: interactions with infectious agent s, phagosomes, and experimental perturbations in function. *Annu Rev Microbiol.* 31, 507–33.
122. Gouterman, M. (1961). Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* 6, 138–163.
123. Green, F., Clausen, C. A., and Highley, T. L. (1989). Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Anal. Biochem.* 182, 197–199.
124. Gu, D., Luo, T., Chen, W., Mi, Y., Gong, X., and Bao, L. (2017). Improved immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Rv0577 by a heterologous prime-boost vaccination strategy in mice. *J. Clin. Exp. Pathol.* 10, 2774–2783.
125. Gunasekera, T. S., Sørensen, A., Attfield, P. V, Sørensen, S. J., and Duncan, A. V. (2002). Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1988–1993.
126. Gupta, A. (2009). Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-

- antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 45–53.
127. Gupta, M., Sajid, A., Sharma, K., Ghosh, S., Arora, G., Singh, R., et al. (2014). HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases in vivo. *J. Bacteriol.* 196, 2646–2657.
 128. Gury, J., Seraut, H., Tran, N., Barthelmebs, L., Weidmann, S., Gervais, P., et al. (2009). Inactivation of PadR , the Repressor of the Phenolic Acid Stress Response , by Molecular Interaction with Usp1 , a Universal Stress Protein from *Lactobacillus plantarum*, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5273–5283.
 129. Gopichand Gutti, Karan Arya and Sushil Kumar Singh*, “Latent Tuberculosis Infection (LTBI) and Its Potential Targets: An Investigation into Dormant Phase Pathogens”, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry (2019) 19: 1627. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190625165512>
 130. Haiser, H. J., Yousef, M. R., and Elliot, M. A. (2009). Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 191, 6501–6512.
 131. Haque, M. M., Khan, S. I., and Ahsan, C. R. (1970). Influence of Some Physicochemical Stresses on the Survival of *Vibrio cholerae* O1 at Non-Culturable State. *Bangladesh J. Microbiol.* 24, 133–136.
 132. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K, Pizova K, Malohlava J, Binder S, Bajgar R, Langova K, Kolar M, Mosinger J, Kolarova H (2014) The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol Res* 169:163–170
 133. Hart, P., Young, M., Jordan, M., Perkins, W., and Geisow, M. (1983). Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study. *J Exp Med.* 158, 477–492.
 134. He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., and Zahrt, T. C. (2006). MprAB Is a Stress-Responsive Two-Component System That Directly Regulates

- Expression of Sigma Factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 188, 2134–2143.
135. Heffron, J. D., Lambert, E. A., Sherry, N., and Popham, D. L. (2010). Contributions of four cortex lytic enzymes to germination of *Bacillus anthracis* spores. *J. Bacteriol.* 192, 763–770.
 136. Heidelberg, J. F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., et al. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3585–3588.
 137. Hengge-Aronis, R. (2002). Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the RpoS Subunit of RNA Polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* sep, 373–395.
 138. Hett, E. C., Chao, M. C., Deng, L. L., and Rubin, E. J. (2008). A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog.* 4, e1000001.
 139. Hett, E. C., Chao, M. C., and Rubin, E. J. (2010). Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. *PLoS Pathog.* 6, 1–14.
 140. Hett, E. C., Chao, M. C., Steyn, A. J., Fortune, S. M., Deng, L. L., and Rubin, E. J. (2007). A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 66, 658–668.
 141. Hey-Ferguson, A., Mitchell, M., and Elbein, A. D. (1973). Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* 116, 1084–1085.
 142. Hirsch, C., Ellner, J., Russell, D., and Rich, E. (1994). Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 152, 743–753.
 143. Hobby, G. L., and Lenert, T. F. (1957). The *in vitro* action of antituberculous agents against multiplying and non-multiplying microbial cells. *Am. Rev. Tuberc.* 76, 1031–48.

144. Hoeltje, J. V., Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124, 1067–1076.
145. Hougardy, J. M., Schepers, K., Place, S., Drowart, A., Lechevin, V., Verscheure, V., et al. (2007). Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN- γ release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. *PLoS One* 2, 926.
146. Hutter, B., and Dick, T. (1998). Increased alanine dehydrogenase activity during dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 7–11.
147. Indrigo, J., Hunter, R. L., and Actor, J. K. (2003). Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 149, 2049–2059.
148. Jones, G., and Dyson, P. (2006). Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside. *J. Bacteriol.* 188, 7470–7476.
149. Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., et al. (1999). Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.* 33, 1103–1117.
150. Jungwirth, B., Emer, D., Brune, I., Hansmeier, N., Alfred, P., Eikmanns, B. J., et al. (2008). Triple transcriptional control of the resuscitation promoting factor 2 (rpf2) gene of *Corynebacterium glutamicum* by the regulators of acetate metabolism RamA and RamB and the cAMP-dependent regulator GlxR. *FEMS Microbiol Lett* 281, 190–197.
151. Kalamidas, S. A., Kuehnelt, M. P., Peyron, P., Rybin, V., Rauch, S., Kotoulas, O. B., et al. (2006). cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria. *J. Cell Sci.* 119, 3686–3694.
152. Kalscheuer, R., and Koliwer-Brandl, H. (2014). Genetics of Mycobacterial Trehalose Metabolism. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–15.
153. Kalscheuer, R., Syson, K., Veeraraghavan, U., Weinrick, B., Biermann, K. E.,

- Liu, Z., et al. (2010). Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by targeting GlgE in an α -glucan pathway. *Nat. Chem. Biol.* 6, 376–384.
154. Kana, B. D., Gordhan, B. G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E. E., et al. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 67, 672–684.
155. Kana, B. D., and Mizrahi, V. (2010). Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58, 39–50.
156. Kang, C., Nyayapathy, S., Lee, J., Suh, J., and Husson, R. N. (2008). Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 154, 725–735.
157. Kaprelyants, A., Gottschal, J., and Kell, D. (1993). Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 271–285.
158. Kaprelyants, A., and Kell, D. (1993). Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation. *Appl Env. Microbiol.* 59, 3187–3196.
159. Karakousis, P. C., Yoshimatsu, T., Lamichhane, G., Woolwine, S. C., Nuermberger, E. L., Grosset, J., et al. (2004). Dormancy Phenotype Displayed by Extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within Artificial Granulomas in Mice. *J. Exp. Med.* 200, 647–657.
160. Keep, N. H., Ward, J. M., Cohen-gonsaud, M., and Henderson, B. (2006). Wake up ! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *TRENDS Microbiol.* 14, 271–276.
161. Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., and Barer, M. R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: A review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 169–187.
162. Keren, I., Minami, S., Rubin, E., and Lewis, K. (2011). Characterization and

- transcriptome analysis of *mycobacterium tuberculosis* persists. *MBio* 2, 3–12.
163. Kerwin, J. L. (1982). Chemical Control of the Germination of Asexual Spores of *Entornophthora culicis* , a Fungus Parasitic on Dipterans. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2179–2186.
 164. Khomenko, A.G., Golyshevskaya, V.I. (1984). Filtrable forms of mycobacteria tuberculosis. *Z Erkr Atmungsorgane.* 162(2), 147-54.
 165. Kim, S. Y., Lee, B. S., Sung, J. S., Kim, H. J., and Park, J. K. (2008). Differentially expressed genes in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under mild acidic and hypoxic conditions. *J. Med. Microbiol.* 57, 1473–1480.
 166. Klinkenberg, L. G., Lee, J., Bishai, W. R., and Karakousis, P. C. (2010). The Stringent Response Is Required for Full Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea Pigs. *J. Infect. Dis.* 202, 1397–1404.
 167. Klinkenberg, L. G., Sutherland, L. A., Bishai, W. R., and Karakousis, P. C. (2008). Metronidazole Lacks Activity against *Mycobacterium tuberculosis* in an In Vivo Hypoxic Granuloma Model of Latency. *J. Infect. Dis.* 198, 275–283.
 168. Knapp, G. S., Lyubetskaya, A., Peterson, M. W., Gomes, A. L. C., Ma, Z., Galagan, J. E., et al. (2015). Role of intragenic binding of cAMP responsive protein (CRP) in regulation of the succinate dehydrogenase genes Rv0249c-Rv0247c in TB complex mycobacteria. *Nucleic Acids Res.* 43, 5377–5393.
 169. Knapp, G. S., and McDonough, K. A. (2014). Cyclic AMP Signaling in Mycobacteria. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–14. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0011-2013.
 170. Koenig, K., and Schneckenburger, H. (1994). Laser-Induced Autofluorescence for Medical Diagnosis. *J. Fluoresc.* 4, 17–40.
 171. Kolter, R., Siegele, D. A., and Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 855–874.
 172. Kondratieva, E., Logunova, N., Majorov, K., Averbakh, M., and Apt, A. (2010). Host Genetics in Granuloma Formation: Human-Like Lung Pathology in Mice with Reciprocal Genetic Susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. avium*. *PLoS*

173. Korch, S. B., Contreras, H., and Clark-Curtiss, J. E. (2009). Three *Mycobacterium tuberculosis* rel toxin-antitoxin modules inhibit mycobacterial growth and are expressed in infected human macrophages. *J. Bacteriol.* 191, 1618–1630.
174. Kornberg, A., Rao, N. N., and Ault-riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 89–125.
175. Krietsch, W. K. G., and Bucher, T. (1970). 3-Phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast. *Eur. J. Biochem.* 17, 568–580.
176. Kuhl, P. W. (1994). Excess-substrate inhibition in enzymology and high-dose inhibition in pharmacology: a re-interpretation. *Biochem. J.* 298, 171–180.
177. Kumar, A., Deshane, J. S., Crossman, D. K., Bolisetty, S., Yan, B. S., Kramnik, I., et al. (2008). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. *J. Biol. Chem.* 283, 18032–18039.
178. Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R., and Steyn, A. J. C. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 11568–73.
179. Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., and Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240–21243.
180. Lakowicz, J. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy.* , ed. Springer.
181. Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., et al. (2008). The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J. Bacteriol.* 190, 4360–4366.
182. Lee, D. G., Park, S. J., and Kim, S. J. (2007). Influence of pipe materials and VBNC cells on culturable bacteria in a chlorinated drinking water model system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1558–1562.

183. Lee, M., Hessek, D., Shah, I., Oliver, A., Dworkin, J., and Mobashery, S. (2010). Synthetic Peptidoglycan Motifs for Germination of Bacterial Spores. *Chembiochem.* 11, 2525–2529.
184. Leistikow, R. L., Morton, R. A., Bartek, I. L., Frimpong, I., Wagner, K., and Voskuil, M. I. (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Assists in Metabolic Homeostasis and Enables Rapid Recovery from Nonrespiring Dormancy. *J Bacteriol.* 192, 1662–1670.
185. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48–56.
186. Li, H., Su, H., Kim, S. B., Chang, Y. K., Hong, S. K., Seo, Y. G., et al. (2012). Enhanced production of trehalose in *Escherichia coli* by homologous expression of otsBA in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 224–232.
187. Li, K., Jiang, T., Yu, B., Wang, L., Gao, C., Ma, C., et al. (2013). *Escherichia coli* transcription termination factor NusA: heat-induced oligomerization and chaperone activity. *Sci. Rep.* 3, 2347.
188. Lillebaek, T., Dirksen, A., Baess, I., Strunge, B., Thomsen, V. Ø., and Andersen, Å. B. (2002). Molecular Evidence of Endogenous Reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 Years of Latent Infection. *J. Infect. Dis.* 185, 401–404.
189. Lillebaek, T., Dirksen, A., Vynnycky, E., Baess, I., Thomsen, V. O., and Andersen, Å. B. (2003). Stability of DNA Patterns and Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* Reactivation Occurring Decades after the Initial Infection. *J. Infect. Dis.* 188, 1032–1039.
190. Lin, P. L., Dartois, V., Johnston, P. J., Janssen, C., Via, L., Goodwin, M. B., et al. (2012). Metronidazole prevents reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14188–14193.
191. Liu, J., and Nikaido, H. (1999). A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates.

192. Liu, P., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B., Krutzik, S., et al. (2006). Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D–Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* (80-.). 311, 1770–3.
193. Loebel, R. O., Shorr, E., and Richardson, H. B. (1933). The influence of foodstuffs upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli. *J. Bacteriol.* 26, 139–66.
194. Low, K., Rao, P., Shui, G., Bendt, A., Pethe, K., Dick, T., et al. (2009). Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J. Bacteriol.* 191, 5037–5043.
195. Lubelski, J., De Jong, A., Van Merkerk, R., Agustiandari, H., Kuipers, O. P., Kok, J., et al. (2006). LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 61, 771–781.
196. Maalej, S., Gdoura, R., Dukan, S., Hammami, A., and Bouain, A. (2004). Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. *J. Appl. Microbiol.* 97, 557–565.
197. MacMicking, J., North, R., LaCourse, R., Mudgett, J., Shah, S., and Nathan, C. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 5243–5248.
198. Madoori, P. K., Agustiandari, H., Driessen, A. J. M., and Thunnissen, A.-M. W. H. (2009). Structure of the transcriptional regulator LmrR and its mechanism of multidrug recognition. *EMBO J.* 28, 156–166.
199. Magnusson, L. U., Farewell, A., and Nyström, T. (2005). ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 13, 236–242.
200. Mahapatra, S., Crick, D. C., McNeil, M. R., and Brennan, P. J. (2008). Unique structural features of the peptidoglycan of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* 190, 655–661.

201. Malik, Z. A., Iyer, S. S., and Kusner, D. J. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* Phagosomes Exhibit Altered Calmodulin-Dependent Signal Transduction: Contribution to Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion and Intracellular Survival in Human Macrophages Zulfiqar. *J Immunol* 166, 3392–3401.
202. Marrero, J., Trujillo, C., Rhee, K. Y., and Ehrt, S. (2013). Glucose phosphorylation Is required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence in mice. *PLoS Pathog.* 9(1):e1003116.
203. Mauck, J., Chan, L., and Glaser, L. (1971). Turnover of the Cell of Gram-positive Bacteria. *J Biol Chem.* 246, 1820–1827.
204. McBride, M. J., and Ensign, J. C. (1990). Regulation of trehalose metabolism by *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* 172, 3637–3643.
205. McDermott, W. (1969). Microbial persistence. *Harvey Lect.* 63, 1–31.
206. Mcdonough, K. A., Kress, Y., and Bloom, B. R. (1993). Pathogenesis of Tuberculosis : Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Macrophages. *Infect Immun. Immun.* 61, 2763–2773.
207. McDougald, D., Rice, S. A., Weichert, D., and Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: Adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 1–9.
208. Mckinney, J. D., Ho, K., Ner Zu Bentrup, È., Mun Ä Oz-Elö Âas, E. J., Miczak²³, A., Chen, B., et al. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735–738.
209. McKinney, J. D., Höner Zu Bentrup, K., Muñoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., et al. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735–738.
210. McMurray, D. N., Collins, F. M., Dannenberg, A. M., and Smith, D. W. (1996). Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 215, 157–179.
211. Miah, F., Koliwer-Brandl, H., Rejzek, M., Field, R. A., Kalscheuer, R., and

- Bornemann, S. (2013). Flux through trehalose synthase flows from trehalose to the alpha anomer of maltose in mycobacteria. *Chem. Biol.* 20, 487–493.
212. Miner, M. D., Chang, J. C., Pandey, A. K., Sasseti, C. M., and Sherman, D. R. (2009). Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 407–411.
213. Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G., and Husson, R. N. (2011). The Extracytoplasmic Domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser / Thr Kinase PknB Binds Specific Muropeptides and Is Required for PknB Localization. *PLoS Pathog.* 7, e1002182.
214. Mishra, A., and Sarkar, D. (2015). Qualitative and quantitative proteomic analysis of Vitamin C induced changes in *Mycobacterium smegmatis*. *Front. Microbiol.* 6, 1–10.
215. Molina-Henares, A. J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A., and Ramos, J. L. (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 157–186.
216. Molinary, R., and Lara, F. (1958). The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum*. *Biochem. J.* 75, 57–65.
217. Molle, V., and Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: Mycobacterium shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064–1077.
218. Monahan, I. M., Betts, J., Banerjee, D. K., and Butcher, P. D. (2001). Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147, 459–471.
219. Motaal, A. A., Tews, I., Schultz, J. E., and Linder, J. U. (2006). Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J.* 273, 4219–4228.
220. Mukamolova, G., Kaprelyants, A., Kell, D., and M., Y. (2003). Adoption of the transiently non-culturable state - a bacterial survival strategy?

221. Mukamolova, G., Turapov, O., Young, D. I., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., and Young, M. (2002a). A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 46, 623–635.
222. Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M., and Kell, D. B. (1998). A bacterial cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8916–8921.
223. Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., et al. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol. Microbiol.* 59, 84–98.
224. Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., et al. (2002c). The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol. Microbiol.* 46, 611–621.
225. Mukamolova, G. V., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G., and Barer, M. R. (2010). Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 174–180.
226. Muñoz-Elías, E. J., and McKinney, J. D. (2005). *M. tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence. *Nat Med.* 11, 638–644.
227. Murphy, H. N., Stewart, G. R., Mischenko, V. V., Apt, A. S., Harris, R., McAlister, M. S. B., et al. (2005). The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 280, 14524–14529.
228. Muttucumaru, D. G. N., Roberts, G., Hinds, J., Stabler, R. A., and Parish, T. (2004). Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis* 84, 239–246.
229. Newton, G. L., Buchmeier, N., and Fahey, R. C. (2008). Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 471–494.
230. Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2002). Mycothiol biochemistry. *Arch. Microbiol.* 178, 388–394.

231. Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R., Talts, J. F., Salzer, J. L., Brennan, P. J., et al. (2000). Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* 103, 511–524.
232. Nguyen, L., Chinnapapagari, S., and Thompson, C. J. (2005). FbpA-dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 187, 6603–6611.
233. Nikitushkin, V., Demina, G., and Kaprel'iantz, A. (2011). Effect of secreted Rpf protein on intercellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures. *Mikrobiologiya* 80, 155–161.
234. Nikitushkin, V.D., Trenkamp, S., Demina, G.R., Shleeve 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.
235. Nikonenko, B. V., Averbakh, M. M., Apt, A. S., Lavebratt, C., and Schurr, E. (2000). Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber. Lung Dis.* 80, 15–25.
236. Nyström, T. (2001). Not quite dead enough: On bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch. Microbiol.* 176, 159–164.
237. Nyström, T. (2003a). Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol. Microbiol.* 48, 17–23.
238. Nyström, T. (2003b). Nonculturable bacteria: Programmed survival forms or cells at death's door? *BioEssays* 25, 204–211.
239. O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–21.
240. Ohno, H., Zhu, G., Mohan, V. P., Chu, D., Kohno, S., Jacobs, W. R., et al. (2003). The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 5, 637–648.
241. Oliver, J. D. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J.*

Microbiol. 43, 93–100.

242. Oliver, J. D. (2009). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34, 415–425.
243. Oliver, J. D., Dagher, M., and Linden, K. (2005). Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J. Water Health* 3, 249–257.
244. Opie, E. (1927). Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions. *Arch. Pathol. Lab Med.* 41–21 4, 1–21.
245. O’Riordan K, Sharlin DS, Gross J, Chang S, Errabelli D, Akilov OE, Kosaka S, Nau GJ, Hasan T (2006) Photoinactivation of mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized *Mycobacterium bovis* BCG-induced granulomatous infection. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1828–1834
246. Ortiz, C. H., Maia, J. C. C., Tenan, M. N., Braz-Padrão, G. R., Mattoon, J. R., and Panek, A. D. (1983). Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *J. Bacteriol.* 153, 644–651.
247. Pang, X., and Howard, S. T. (2007). Regulation of the α -crystallin gene *acr2* by the MprAB two-component system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 189, 6213–6221.
248. Pang, X., Samten, B., Cao, G., Wang, X., Tvinnereim, A. R., Chen, X. L., et al. (2013). MprAB regulates the *espA* operon in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates ESX-1 function and host cytokine response. *J. Bacteriol.* 195, 66–75.
249. Pang, X., Vu, P., Byrd, T. F., Ghanny, S., Soteropoulos, P., Mukamolova, G. V., et al. (2007). Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an *mprAB* deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 153, 1229–1242.
250. Paramasivan, C. N., Sulochana, S., Kubendiran, G., Venkatesan, P., and Mitchison, D. A. (2005). Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium*

- tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 627–631.
251. Parish, T. (2014). Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–14.
252. Park, H., Guinn, K. M., Harrell, M. I., Liao, R., Voskuil, M. I., Tompa, M., et al. (2003). Rv3133c / dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 48, 833–843.
253. Patel, M., and Day, B. J. (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 359–364.
254. Peddireddt, V., Doddam, S. N., and Ahmed, N. (2017). Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front. Immunol.*, 1–19.
255. Pedersen, K., Christensen, S. K., and Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 45, 501–510.
256. Pedroza-Roldán, C., Aceves-Sánchez, M., Zaveri, A., Charles-Niño, C., Elizondo-Quiroga, DE Hernández-Gutiérrez, R., Allen, K., et al. (2015). The adenylyl cyclase Rv2212 modifies the proteome and infectivity of *Mycobacterium bovis* BCG. *Folia Microbiol* 60, 21–31.
257. Phong, W. Y., Lin, W., Rao, S. P. S., Dick, T., Alonso, S., and Pethe, K. (2013). Characterization of Phosphofructokinase Activity in *Mycobacterium tuberculosis* Reveals That a Functional Glycolytic Carbon Flow Is Necessary to Limit the Accumulation of Toxic Metabolic Intermediates under Hypoxia. *PLoS One* 8.
258. Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O., and Cristofalo, V. J. (1994). Alterations in contact and density-dependent arrest state in senescent WI-38 cells. *Vitr. Cell. Dev. Biol* 30A, 471–476.
259. Porter, J., Edwards, C., and Pickup, R. W. (1995). Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 399–408.

260. Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C. E. (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182, 4889–4898.
261. Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., and Carpousis, A. J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381, 169–72.
262. Qamra, R., Mande, S. C., Coates, A. R. M., and Henderson, B. (2005). The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85, 385–394.
263. Qazi, S. S., and Khachatourians, G. G. (2008). Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Arch. Microbiol.* 189, 589–596.
264. Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M. A. R., and Colwell, R. R. (1996). Potential Virulence of Viable but Nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 115–120.
265. Rahman, M. A., Sobia, P., Gupta, N., Van Kaer, L., and Das, G. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* subverts the TLR-2 - MyD88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol. *PLoS One* 9.
266. Ramage, H. R., Connolly, L. E., and Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* 5.
267. Ramakrishnan, L., Federspiel, N. A., and Falkow, S. (2000). Granuloma-Specific Expression of *Mycobacterium* Virulence Proteins from the Glycine-Rich PE-PGRS Family. *Science* (80-.). 288, 1436–1439.
268. Ranganathan, S., Bai, G., Lyubetskaya, A., Knapp, G. S., Peterson, M. W., Gazdik, M., et al. (2016). Characterization of a cAMP responsive transcription factor, Cmr (Rv1675c), in TB complex mycobacteria reveals overlap with the DosR (DevR) dormancy regulon. *Nucleic Acids Res.* 44, 134–151.
269. Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., and Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG.

Microbiology 147, 1017–1024.

270. Rao, S., Ogata, K., and Catanzaro, A. (1993). *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* binds to the integrin receptor alpha v beta 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 61, 663–670.
271. Raychaudhuri, S., Basu, M., and Mandal, N. C. (1998). Glutamate and cyclic AMP regulate the expression of galactokinase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 144, 2131–2140.
272. Rickman, L., Scott, C., Hunt, D. M., Hutchinson, T., Carmen, M., Whalan, R., et al. (2005). A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol.* 56, 1274–1286.
273. Rieger, M., Mauch, H., and Hakenbeck, R. (2017). Long Persistence of a *Streptococcus pneumoniae* 23F Clone in a Cystic Fibrosis Patient . *mSphere* 2, 1–11.
274. Rifat, D., Bishai, W. R., and Karakousis, P. C. (2009). Phosphate Depletion: A Novel Trigger for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence. *J Infect Dis.* 200, 1126–35.
275. Rook, G. A. W., Seah, G., and Ustianowski, A. (2001). *M. tuberculosis*: Immunology and vaccination. *Eur. Respir. J.* 17, 537–557.
276. Rosenkrands, I., Slayden, A. R., Janne, C., Aagaard, C., Barry, C. E., and Andersen, P. (2002). Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol.* 184, 3485–3491.
277. Roszak, D. B., and Colwell, R. R. (1987a). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2889–2893.
278. Roszak, D. B., and Colwell, R. R. (1987b). Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365–379.
279. Ruggiero, A., Marchant, J., Squeglia, F., Makarov, V., De Simone, A., and

- Berisio, R. (2013). Molecular determinants of inactivation of the resuscitation promoting factor B from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 31, 195–205.
280. Ruggiero, A., Squeglia, F., Esposito, C., Marasco, D., Pedone, E., Pedone, C., et al. (2010). Expression , Purification , Crystallization and Preliminary X-Ray Crystal- lographic Analysis of the Resuscitation Promoting Factor Interacting Pro- tein RipA from M . tuberculosis. *Protein Pept. Lett.* 17, 70–73.
281. Ruggiero, A., Squeglia, F., Pirone, L., Correale, S., and Berisio, R. (2011). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a major fragment of the resuscitation-promoting factor RpfB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 164–168.
282. Ruggiero, A., Tizzano, B., Pedone, E., Pedone, C., Wilmanns, M., and Berisio, R. (2009). Crystal structure of the resuscitation promoting factor (DeltaDUF)RpfB from M. tuberculosis. *Mol Biol* 385, 153–62.
283. Russell-Goldman, E., Xu, J., Wang, X., Chan, J., and Tufariello, J. M. (2008). A *Mycobacterium tuberculosis* Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infect. Immun.* 76, 4269–4281.
284. Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis ? *Nat Rev Microbiol.* 5, 39–47. doi:10.1038/nrmicro1538.
285. Russell, D. G., Vandervan, B. C., Lee, W., Abramovitch, R. B., Homolka, S., Niemann, S., et al. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. *Cell Host Microbe* 8, 68–76.
286. Rustad, T. R., Harrell, M. I., Liao, R., and Sherman, D. R. (2008). The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 3, 1–8.
287. Rustad, T. R., Sherrid, A. M., Minch, K. J., and Sherman, D. R. (2009). Hypoxia: A window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell. Microbiol.* 11, 1151–1159.
288. Sajid, A., Arora, G., Gupta, M., Singhal, A., Chakraborty, K., Nandicoori, V.

- K., et al. (2011). Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation. *J. Bacteriol.* 193, 5347–5358.
289. Sajish, M., Tiwari, D., Rananaware, D., Nandicoori, V. K., and Prakash, B. (2007). A charge reversal differentiates (p)ppGpp synthesis by monofunctional and bifunctional Rel proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 34977–34983.
 290. Sala, C., Dhar, N., Hartkoorn, R. C., Zhang, M., Ha, Y. H., Schneider, P., et al. (2010). Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4150–4158.
 291. Salina, E. G., Mollenkopf, H. J., Kaufmann, S. H. E., and Kaprelyants, A. S. (2009). *M. tuberculosis* gene expression during transition to the “non-culturable” state. *Acta Naturae* 1, 73–7.
 292. Salina, E. G., Waddell, S. J., Hoffmann, N., Rosenkrands, I., Butcher, P. D., and Kaprelyants, A. S. (2014). Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from , non-culturable (dormant) states. *Open Biol.* 4, 140106.
 293. Santra, M., Dill, K. A., and de Graff, A. M. R. (2018). How Do Chaperones Protect a Cell’s Proteins from Oxidative Damage? *Cell Syst.* 6, 743-751.e3.
 294. Saunders, B. M., and Britton, W. J. (2007). Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 103–111.
 295. Saux, M. F., Hervio-heath, D., Loaec, S., Colwell, R. R., and Pommepuy, M. (2002). Detection of Cytotoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5641–5646.
 296. Schaloske, R. H., Blaesius, D., Schlatterer, C., and Lusche, D. F. (2007). Arachidonic acid is a chemoattractant for *Dictyostelium discoideum* cells. *J. Biosci.* 32, 1281–1289.
 297. Schlesinger, L. (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150, 2920–2930.

298. Schlesinger, L., Kaufman, T., Iyer, S., Hull, S., and Marchiando, L. (1996). Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol* 157, 4568–4575.
299. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., et al. (2003). Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med.* 198, 693–704.
300. Schubert, O. T., Ludwig, C., Kogadeeva, M., Kaufmann, S. H. E., Sauer, U., Schubert, O. T., et al. (2015). Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe* 18, 1–13.
301. Schuster, C. F., and Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 73–85.
302. Schütz, A., Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Hübner, G., et al. (2003). Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.* 270, 2322–2331.
303. Shah, I., Laaberki, M., Popham, D., and Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135, 486–496.
304. Sharp, J. D., Cruz, J. W., Raman, S., Inouye, M., Husson, R. N., and Woychik, N. A. (2012). Growth and translation inhibition through sequence-specific RNA binding by *Mycobacterium tuberculosis* VapC toxin. *J. Biol. Chem.* 287, 12835–12847.
305. Sherman, D. R., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Arain, T. M., Mahairas, G. G., Yuant, Y., et al. (1995). Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6625–6629.
306. Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., and Schoolnik, G. K. (2001). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic

- response gene encoding alpha -crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7534–9.
307. Shi, L., Jung, Y.-J., Tyagi, S., Gennaro, M. L., and North, and R. J. (1993). Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Inorg. Chem.* 32, 2221–2223.
 308. Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., et al. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11210–11215.
 309. Shih MH, Huang FC (2011) Effects of photodynamic therapy on rapidly growing nontuberculous mycobacteria keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52:223–229
 310. Shleeve, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D., and Kaprelyants, A. S. (2004). Formation of “non-culturable” cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology* 150, 1687–1697.
 311. Shleeve, M. O., Bagramyan, K., Telkov, M. V., Mukamolova, G. V., Young, M., Kell, D. B., et al. (2002). Formation and resuscitation of “non-culturable” cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology* 148, 1581–1591.
 312. Signorello, C., Lleò, M. D. M., and Canepari, P. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* 44, 125–131.
 313. Singh, A., Crossman, D. K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M. I., Renfrow, M. B., et al. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog.* 5, e1000545.
 314. Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K. V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K. E., et al. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival.

315. Sirakova, T., Dubey, V., Deb, C., Daniel, J., Korotkova, T., Abomoelak, B., et al. (2006). Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J. Biol. Chem.* 152, 2717–2725.
316. Smith, B., and Oliver, J. D. (2006). In Situ and In Vitro Gene Expression by *Vibrio vulnificus* during Entry into, Persistence within, and Resuscitation from the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1445–1451.
317. Squeglia, F., Ruggiero, A., Romano, M., Vitagliano, L., and Berisio, R. (2014). Mutational and structural study of RipA, a key enzyme in *Mycobacterium tuberculosis* cell division: evidence for the L-to-D inversion of configuration of the catalytic cysteine. *Acta Crystallogr. Sect. D* D70, 2295–2300.
318. Starck, J., Ka, G., Marklund, B., Andersson, D. I., and Thomas, A. (2004). Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* 150, 3821–3829.
319. Steyn, A. J. C., Collins, D. M., Hondalus, M. K., Jacobs, W. R., Kawakami, R. P., and Bloom, B. R. (2002). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for *in vivo* growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3147–3152.
320. Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P., Chakraborty, P., Haddix, P., Collins, H., Fok, A., et al. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* (80-.). 263, 778–781.
321. Sung N, Back S, Jung JH, Kim KH, Kim JK, Lee JH, Ra Y, Yang HC, Lim C, Cho S, Kim K, Jheon S (2013) Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-*Mycobacterium tuberculosis* by photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn Ther* 10:694–702
322. Sunnarborg, A., Klumpp, D., Chung, T., and LaPorte, D. C. (1990). Regulation of the glyoxylate bypass operon: Cloning and characterization of *iclR*. *J. Bacteriol.* 172, 2642–2649.
323. Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Singh, A. K., Dasgupta, A., Rodrigue, S., et al.

- (2007). Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 65, 261–276.
324. Sureka, K., Ghosh, B., Dasgupta, A., Basu, J., Kundu, M., and Bose, I. (2008). Positive feedback and noise activate the stringent response regulator rel in mycobacteria. *PLoS One* 3.
 325. Susin, M. F., Baldini, R. L., Gueiros-Filho, F., and Gomes, S. L. (2006). GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 188, 8044–8053.
 326. Sussman, A. S. (1969). The dormancy and germination of fungus spores. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 23, 99–121.
 327. Sussman, A. S., and Halvorson, H. O. (1966). *Spores. Their dormancy and germination.*, ed. L. N.Y.
 328. Süssstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C. J. (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 30, 33–46.
 329. Talaat, A. M., Ward, S. K., Wu, C. W., Rondon, E., Tavano, C., Bannantine, J. P., et al. (2007). Mycobacterial bacilli are metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: Insights from genome-wide transcriptional profiling. *J. Bacteriol.* 189, 4265–4274.
 330. Taneja, N. K., Dhingra, S., Mittal, A., Naresh, M., and Tyagi, J. S. (2010). *Mycobacterium Tuberculosis* Transcriptional Adaptation, Growth Arrest and Dormancy Phenotype Development is Triggered by Vitamin C. *PLoS One* 5, 18–24.
 331. Tauch, A., Kaiser, O., Hain, T., Goesmann, A., Weisshaar, B., Albersmeier, A., et al. (2005). Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen. *J. Bacteriol.* 187, 4671–4682.
 332. Thayil, S. M., Morrison, N., Schechter, N., Rubin, H., and Karakousis, P. C. (2011). The role of the novel exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and persistence. *PLoS One* 6.

333. Thevelein, J. M. (1984). Regulation of trehalase mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48, 42–59.
334. Thevelein, J. M., den Hollander, J. a, and Shulman, R. G. (1982). Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlation with trehalose breakdown as studied by in vivo ¹³C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3503–7.
335. Thevelein, J. M., and Jones, K.-A. (1983). Reversibility characteristics of glucose-induced trehalase activation associated with the breaking of dormancy in yeast ascospores. *Eur. J. Biochem.* 136, 583–387.
336. Tholozan, J. L., Cappellet, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., and Federighi, M. (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1110–1116.
337. Thomson, N. R. L., Nasser, W., McGowan, S., Sebaihia, M., and Salmond, G. P. C. (1999). *Erwinia carotovora* has two Kdg R-li ke proteins belonging to the IclR family of transcriptional regulators : identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 145, 1531–1545.
338. Tran, N. P., Gury, J., Dartois, V., Nguyen, T. K. C., Seraut, H., Barthelmebs, L., et al. (2008). Phenolic acid-mediated regulation of the padC gene, encoding the phenolic acid decarboxylase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 3213–3224.
339. Tran, S. L., Rao, M., Simmers, C., Gebhard, S., Olsson, K., and Cook, G. M. (2005). Mutants of *Mycobacterium smegmatis* unable to grow at acidic pH in the presence of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Microbiology* 151, 665–672.
340. Trauner, A., Loughheed, K. E. A., Bennett, M. H., Hingley-Wilson, S. M., and Williams, H. D. (2012). The dormancy regulator DosR controls ribosome stability in hypoxic mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 287, 24053–24063.
341. Tribble, G. D., Lamont, R. J., Demuth, D. R., Capestany, C. A., and Maeda, K. (2007). Role of the Clp System in Stress Tolerance, Biofilm Formation, and

- Intracellular Invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 190, 1436–1446.
342. Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., et al. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: Cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* 8, 218–232.
 343. Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pförtner, H., Niemann, S., et al. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog.* 11, 1–26.
 344. Tufariello, J., Mi, K., Xu, J., Manabe, Y., Kesavan, A., Drumm, J., et al. (2006). Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* Resuscitation-Promoting Factor Rv1009 Gene Results in Delayed Reactivation from Chronic Tuberculosis *JoAnn. Infect. Immun.* 74, 2985–2995.
 345. Upadhyay, S., Mittal, E., Philips, J.A. (2018). Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog Dis.* 76(4), fty037.
 346. Tuomanen, E. (1986). Phenotypic tolerance: the search for 3-lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 8, 279–291.
 347. van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., et al. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* 129, 1287–1298.
 348. Van Ingen, J., De Zwaan, R., Dekhuijzen, R., Boeree, M., and Van Soolingen, D. (2009). Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character. *J. Bacteriol.* 191, 5865–5867.
 349. Van Schaik, W., and Abee, T. (2005). The role of σ^B in the stress response of Gram-positive bacteria - Targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 218–224.
 350. Van Wezel, G. P., Van der Meulen, J., Kawamoto, S., Luiten, R. G. M., Koerten, H. K., and Kraal, B. (2000). *ssgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating

- septum formation. *J. Bacteriol.* 182, 5653–5662.
351. Vashist, A., Malhotra, V., Sharma, G., Tyagi, J. S., and Clark-Curtiss, J. E. (2018). Interplay of PhoP and DevR response regulators defines expression of the dormancy regulon in virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, jbc.RA118.004331.
 352. Via, L. E., Lin, P. L., Ray, S. M., Carrillo, J., Allen, S. S., Eum, S. Y., et al. (2008). Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits , and Nonhuman Primates. *Infect. Immun.* 76, 2333–2340.
 353. Viridy, K., Sands, T. W., Kopko, S. H., Es, S. Van, Meima, M., Schaap, P., et al. (1999). High cAMP in spores of *Dictyostelium discoideum* : association with spore dormancy and inhibition of germination. *Microbiology* 145, 1883–1890.
 354. Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., and Withers, S. G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412, 835–838.
 355. Vora, G. J., Meador, C. E., Bird, M. M., Bopp, C. A., Andreadis, J. D., and Stenger, D. A. (2005). Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 19109–19114.
 356. Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K. C., Harrell, M. I., Dolganov, G. M., Sherman, D. R., et al. (2003a). Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. *J. Exp. Med.* 198, 705–713.
 357. Voskuil, M. I., Visconti, K. C., and Schoolnik, G. K. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberc. (Edinb)*. 84, 218–227.
 358. Voskuil, M., Schnappinger, D., Visconti, K., Harrell, M., Dolganov, G., Sherman, D., et al. (2003b). Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program The Journal of Experimental Medicine. *J Exp Med.* 198, 705–13.
 359. Wallis, R. S., Patil, S., Cheon, S., Edmonds, K. A. Y., Phillips, M., Perkins, M.

- D., et al. (1999). Drug Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2600–2606.
360. Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., et al. (2012). A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* 8, 855–861.
361. Wayne, L. (1954). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* from resected specimens under various atmospheric conditions. *Am. Rev. Tuberc.* 70, 910–11.
362. Wayne, L. G., and Hayes, L. G. (1996). An *in vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 64, 2062–2069.
363. Wayne, L. G., and Sramek, H. A. (1994). Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2054–2058.
364. Wayne, L., and Lin, K. (1982). Glyoxylate Metabolism and Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to Survival under Anaerobic Conditions. *Infect Immun.* 37, 1042–1049.
365. Wayne, L., and Sohaskey, C. (2001). Nonreplicating persistence of *mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol.* 55, 139–63.
366. Wei, J. U. N., Dahl, J. L., Moulder, J. W., Roberts, E. A., Gaora, P. O., Young, D. B., et al. (2000). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* Gene That Enhances Mycobacterial Survival in Macrophages. *J. Bacteriol.* 182, 377–384.
367. Wiegell SR, Kongshoj B, Wulf HC (2006) *Mycobacterium marinum* infection cured by photodynamic therapy. *Arch Dermatol* 142:1241–1242
368. Welin A, Raffetseder J, Eklund D, Stendahl O, Lerm M. Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. *Journal of Innate Immunity* 2011, 3(5):508-518.
369. Williams, K. J., Joyce, G., and Robertson, B. D. (2010). Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors. *Plasmid* 64, 69–73.

370. Wong, D. K., Lee, B., Horwitz, M. a, and Gibson, W. (1999). Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry identification of fur, aconit. *Infect. Immun.* 67, 327–336.
371. Wood, D. N., Chaussee, M. A., Chaussee, M. S., and Buttaro, B. A. (2005). Persistence of *Streptococcus pyogenes* in stationary-phase cultures. *J. Bacteriol.* 187, 3319–3328.
372. Woodruff, P. J., Carlson, B. L., Siridechadilok, B., Pratt, M. R., Senaratne, R. H., Mougous, J. D., et al. (2004). Trehalose is required for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 279, 28835–28843.
373. Woolhiser, L., Tamayo, M. H., Wang, B., Gruppo, V., Belisle, J. T., Lenaerts, A. J., et al. (2007). In Vivo Adaptation of the Wayne Model of Latent Tuberculosis. *Infect. Immun.* 75, 2621–2625.
374. Wu, X., Yang, Y., Han, Y., Zhang, J., Liang, Y., Li, H., et al. (2008). Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1121–1127.
375. Xie, Z., Siddiqi, N., and Rubin, E. J. (2005). Differential Antibiotic Susceptibilities of Starved *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Differential Antibiotic Susceptibilities of Starved *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1–4.
376. Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszycki, S., van Heyningen, T., Chatterjee, D., Orme, I., Allen, P., Russell, D.G. (1994). Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol.* 153(6), 2568-78.
377. Xu, H., Hegde, S. S., and Blanchard, J. S. (2011). The Reversible Acetylation and Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* Acetyl-CoA Synthetase is Dependent on cAMP. *Biochemistry* 50, 5883–5892.
378. Yakhnin, A. V., Yakhnin, H., and Babitzke, P. (2008). Function of the *Bacillus subtilis* transcription elongation factor NusG in hairpin-dependent RNA

- polymerase pausing in the trp leader. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16131–16136.
379. Yeh, J. I., Du, S., Tortajada, A., Paulo, J., and Zhang, S. (2005). Peptergents: peptide detergents that improve stability and functionality of a membrane protein, glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 44, 16912–16919.
380. Yogeswari, L., and Chacko, C. W. (1971). Persistence of *T. pallidum* and its significance in penicillin-treated seropositive late syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 47, 339–347.
381. Yuan, Y., Crane, D. D., and Barry, C. E. (1996). Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: Function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 178, 4484–4492.
382. Yuan, Y., Leet, R. E., Besrat, G. S., Belislet, J. T., and Barry, C. E. (1995). Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6630–6634.
383. Zahrt, T. C., and Deretic, V. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12706–12711.
384. Zhang, P., Fu, J., Zong, G., Liu, M., Pang, X., and Cao, G. (2018). Novel MprA binding motifs in the phoP regulatory region in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 112, 62–68.
385. Zhang, Y., Yang, Y., Woods, A., Cotter, R. J., and Sun, Z. (2001). Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 542–547.
386. Zhu, L., Sharp, J. D., Kobayashi, H., Woychik, N. A., and Inouye, M. (2010). Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxins can physically and functionally interact. *J. Biol. Chem.* 285, 39732–39738.
387. Zimmermann, M., Kuehne, A., Boshoff, H. I., Barry, C. E., Zamboni, N., and Sauer, U. (2015). Dynamic exometabolome analysis reveals active metabolic pathways in non-replicating mycobacteria. *Environ. Microbiol.* 17, 4802–4815.
388. Бухарин, О. В. (2008). Персистенция бактериальных патогенов как

физиологический феномен. *ВЕСТН. МОСК. УН-ТА*. 16, 6–13.

389. Бухарин, О. В., Гинцбург, А. Л., Романова, Ю. М., and Эль-Регистан, Г. И. (2005). *Механизмы выживания бактерий*. М.: Медицина.
390. Демкина, Е. В., Соина, В. С., and Эль-Регистан, Г. И. (2000a). Образование покоящихся форм *Arthrobacter globiformis* в автолизирующих суспензиях. *Микробиология* 69, 383–388.
391. Демкина, Е. В., Соина, В. С., Эль-Регистан, Г. И., and Звягинцев, Д. Г. (2000b). Репродуктивные покоящиеся формы *Arthrobacter globiformis*. *Микробиология* 69, 377–382.
392. Калакуцкий, Л. В., and Агре, Н. С. (1977). *Развитие актиномицетов*. Москва: Наука.
393. Лойко, Н. Г., Соина, В. С., Сорокин, Д. Ю., Митюшина, Л. Л., and Эль-Регистан, Г. И. (2003). Образование покоящихся форм хемолитоавтотрофных бактерий *Thioalkalivibrio versutus* и *Thioalkalimicrobium aerophilum*. *Микробиология* 72, 328–337.
394. Мулюкин, А. Л., Демкина, Е. В., Кряжевских, Н. А., Сузина, Н. Е., Воробьева, Л. И., Дуда, В. И., et al. (2009). Покоящиеся формы *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter globiformis*, не прорастающие на стандартных средах. *Микробиология* 78, 456–468.
395. Николеишвили Л.Р., П. Л. С. (2004). Переход холерных вибрионов в некультивируемое состояние под влиянием некоторых абиотических факторов. *Фундаментальные исследования* 2, 18–21.
396. Романова, Ю. М., Чегаева, Е. В., and Гинцбург, А. Л. (1998). Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 3, 3–8.
397. Солохина, Л. В., Пушкарева, В. И., and Литвин, В. Ю. (2001). Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 3, 17–22.

398. Сомова, Л. М., Бузолева, Л. С., Исаченко, А. С., and Сомов, Г. П. (2006). Адаптивные изменения почвенных бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 3, 36–40.
399. Ткаченко, А. Г. (2012). *Молекулярные механизмы стрессовых ответов у микроорганизмов*. Екатеринбург: УрО РАН.
400. Ткаченко, А. Г., and Чудинов, А. А. (1989). Изменение пула полиаминов в процессе перехода от анаэробных к аэробным условиям и локализация ферментов их синтеза в клетках *Escherichia coli*. *Микробиология* 58, 885.
401. Эль-Регистан, Г. И., Дуда, В. И., Козлова, А. Н., Митюшина, Л. Л., and Поплаухина, О. Г. (1979). Изменение конструктивного метаболизма и ультраструктурной организации клеток *Bacillus cereus* под влиянием специфического ауторегуляторного фактора. *Микробиология* 48, 240–244.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Белки, выявленные методом двумерного электрофореза в экстрактах вегетативных и покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis*

Белки выявляли в мембранных и цитозольных фракциях клеток вегетативных и покоящихся форм *M.smegmatis*. Вегетативные микобактерии были выращены на среде Сатона 2 дня; покоящиеся формы получали вследствие постепенного закисления среды роста с последующим хранением в микроаэрофильных условиях в течение одного месяца при комнатной температуре в темноте.

В столбцах, обозначенных как «место в протеоме....», отражено место, которое белок занимает среди всех обнаруженных белков во фракции соответствующего типа клеток. Все белки были ранжированы в соответствии с плотностью пятна от самого высокопредставленного (1) до наименее представленного. Белки, которые отсутствовали в конкретном протеоме, обозначены как «N/D». Если одно пятно содержало несколько разных белков, общая плотность пятен распределялась пропорционально между белками. Белки в таблице отсортированы по номеру гена. Данные, полученные с прибора, спектры и результаты поиска, можно обнаружить по ссылке: <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS01462>.

Тип клеток	Название белка (SmeGmalist)		Название гена		Score	Coverage	Место а протеоме покоящихся клеток	Место в протеоме вегетативных клеток	Фракция клеток
Покоящиеся	Нуклеотидил трансфераза	LOCUS	AFP38256	373 aa	78	24%	97	N/D	мембраны
Покоящиеся	аденозилгомоцистеиназа	LOCUS	WP_003893235	485 aa	236	76%	80	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства пептидаз M75	LOCUS	WP_003896817	390 aa	84	14%	47	107	мембраны
Покоящиеся	белок семейства пептидаз M75	LOCUS	WP_003896817	390 aa	429	86%	47	107	мембраны
Вегетативные	Белок, содержащий домен DUF2587	LOCUS	WP_003897773	176 aa	98	34%	N/D	55	цитоплазма
Покоящиеся	дефосфо-КоА киназа	LOCUS	WP_014877836	375 aa	87	67%	76	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	микотиол ацетилтрансфераза	LOCUS	WP_014878453	295 aa	120	64%	120	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства пептидаз M75	LOCUS	WP_029104416	390 aa	384	70%	N/D	80	мембраны
Покоящиеся	бифункциональная фолилполиглутаматсинтаза / дигидрофолатсинтаза	LOCUS	WP_029104421	469 aa	180	71%	130	N/D	мембраны
Покоящиеся	альфа субъединица реактивазы диолдегидратазы	LOCUS	WP_029104561	623 aa	202	46%	150	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	фактор элонгации G	LOCUS	WP_081319411	701 aa	397	74%	107	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	фактор элонгации G	LOCUS	WP_081319411	701 aa	427	56%	65	N/D	мембраны
Покоящиеся	6-фосфоглюконатдегидрогеназа		MSMEG_0002		262	87%	53	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	ДНК-гираза, субъединица A		MSMEG_0006		119	47%	48	N/D	цитоплазма
Вегетативные	пептидил-пролил цис-транс-изомераза B		MSMEG_0024		238	97%	31	4	цитоплазма
Покоящиеся	пептидил-пролил цис-транс-изомераза B		MSMEG_0024		200	92%	31	4	цитоплазма
Покоящиеся	пептидил-пролил цис-транс-изомераза B		MSMEG_0024		168	72%	129	N/D	мембраны
Покоящиеся	серин-треониновая протеинкиназа		MSMEG_0028		335	73%	116	N/D	мембраны
Покоящиеся	антранилатсинтаза компонент 2		MSMEG_0029		164	75%	137	N/D	мембраны
Вегетативные	Белок с доменом FHA		MSMEG_0035		169	54%	99	54	цитоплазма
Вегетативные	Белок с доменом FHA		MSMEG_0035		87	43%	N/D	79	мембраны
Покоящиеся	Белок с доменом FHA		MSMEG_0035		237	65%	99	54	цитоплазма
Покоящиеся	Белок с доменом FHA		MSMEG_0035		84	62%	121	N/D	мембраны

Вегетативные	антиген MTB48	MSMEG_0076	198	51%	N/D	129	цитоплазма
Покоящиеся	оксидоредуктаза, белок семейства цинк-связывающих дегидрогеназ	MSMEG_0097	55	38%	30	N/D	мембраны
Покоящиеся	ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_0108	123	49%	149	N/D	цитоплазма
Вегетативные	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок, семейство белков 3	MSMEG_0114	194	86%	20	17	мембраны
Покоящиеся	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок, семейство белков 3	MSMEG_0114	226	86%	20	17	мембраны
Покоящиеся	оксидоредуктаза, белок семейства цинк-связывающих дегидрогеназ	MSMEG_0127	121	62%	46	N/D	мембраны
Вегетативные	серинэстераза, белок семейства кутиназ	MSMEG_0194	94	53%	N/D	122	цитоплазма
Вегетативные	L-сорбозондегидрогеназа	MSMEG_0214	147	62%	121	37	мембраны
Покоящиеся	L-сорбозондегидрогеназа	MSMEG_0214	144	63%	121	37	мембраны
Вегетативные	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_0216	323	91%	75	50	цитоплазма
Покоящиеся	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_0216	165	70%	75	50	цитоплазма
Покоящиеся	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_0216	69	41%	92	N/D	мембраны
Вегетативные	моноглицерид липаза	MSMEG_0220	367	87%	N/D	34	мембраны
Вегетативные	O-метилтрансфераза MdmC	MSMEG_0224	95	72%	N/D	53	цитоплазма
Покоящиеся	металлопептидаза	MSMEG_0234	421	79%	35	N/D	цитоплазма
Вегетативные	секретируемая пептидаза	MSMEG_0247	124	34%	N/D	79	мембраны
Покоящиеся	фосфоенолпируваткарбоксикиназа	MSMEG_0255	172	58%	24	N/D	цитоплазма
Вегетативные	3-оксоацил- [ацил-белок-носитель] редуктаза	MSMEG_0269	121	77%	N/D	31	цитоплазма
Покоящиеся	оксидоредуктаза, связывание FAD	MSMEG_0301	65	50%	55	N/D	цитоплазма
Вегетативные	2-дегидро-3-дезоксифосфоглюконат альдолаза / 4-гидрокси-2-оксоглутарат альдолаза	MSMEG_0312	97	52%	139	126	цитоплазма
Покоящиеся	2-дегидро-3-дезоксифосфоглюконат альдолаза / 4-гидрокси-2-оксоглутарат альдолаза	MSMEG_0312	137	63%	139	126	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0317	286	75%	N/D	40	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0317	380	77%	111	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0365	196	62%	N/D	76	мембраны
Вегетативные	белок с МаоС-подобным доменом	MSMEG_0371	153	44%	44	91	мембраны
Покоящиеся	белок с МаоС-подобным доменом	MSMEG_0371	275	60%	44	91	мембраны
Вегетативные	оксидоредуктаза, белок семейства короткоцепочечных дегидрогеназ / редуктаз	MSMEG_0372	411	88%	N/D	99	цитоплазма

Вегетативные	оксидоредуктаза, белок семейства короткоцепочечных дегидрогеназ / редуктаз	MSMEG_0372	228	86%	2	2	мембраны
Покоящиеся	оксидоредуктаза, белок семейства короткоцепочечных дегидрогеназ / редуктаз	MSMEG_0372	401	90%	2	2	мембраны
Вегетативные	3-кетоацил-КоА тиолаза	MSMEG_0373	195	63%	7	12	мембраны
Покоящиеся	3-кетоацил-КоА тиолаза	MSMEG_0373	394	74%	7	12	мембраны
Вегетативные	Белок Rmt2	MSMEG_0387	160	64%	N/D	11	мембраны
Вегетативные	Макроцин-О-метилтрансфераза	MSMEG_0388	127	68%	N/D	56	мембраны
Вегетативные	трансфераза	MSMEG_0422	102	61%	96	15	цитоплазма
Покоящиеся	трансфераза	MSMEG_0422	187	83%	96	15	цитоплазма
Вегетативные	Периплазматический связывающий белок	MSMEG_0438	228	79%	N/D	118	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок, предполагаемый	MSMEG_0441	48	68%	86	N/D	мембраны
Вегетативные	фосфометилпиримидинкиназа	MSMEG_0464	264	87%	N/D	81	цитоплазма
Вегетативные	вероятный переносчик сахара ABC, субстрат-связывающий белок, предполагаемый	MSMEG_0505	146	60%	N/D	5	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_0531	126	49%	127	N/D	цитоплазма
Вегетативные	внутриклеточная протеаза, белок семейства PfpI	MSMEG_0536	150	78%	N/D	126	цитоплазма
Вегетативные	регулятор транскрипции, белок семейства Crg / Fnr	MSMEG_0539	106	54%	N/D	14	мембраны
Вегетативные	сульфонат-связывающий белок	MSMEG_0550	341	78%	N/D	15	мембраны
Вегетативные	ABC нитрат / сульфат / бикарбонатный переносчик, субъединица АТФазы	MSMEG_0551	69	18%	N/D	61	мембраны
Покоящиеся	транс-аконитат-2-метилтрансфераза	MSMEG_0629	142	61%	120	N/D	цитоплазма
Вегетативные	олигопептид транспортный АТФ-связывающий белок AppF	MSMEG_0639	282	81%	20	54	мембраны
Покоящиеся	олигопептид транспортный АТФ-связывающий белок AppF	MSMEG_0639	392	80%	20	54	мембраны
Вегетативные	транспорт олигопептидов АТФ-связывающий белок OppD	MSMEG_0640	157	68%	31	73	мембраны
Покоящиеся	транспорт олигопептидов АТФ-связывающий белок OppD	MSMEG_0640	94	46%	31	73	мембраны
Вегетативные	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок	MSMEG_0643	275	59%	59	84	цитоплазма
Вегетативные	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок	MSMEG_0643	457	68%	1	9	мембраны
Покоящиеся	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок	MSMEG_0643	349	54%	59	84	цитоплазма
Покоящиеся	внеклеточный связывающий растворенные вещества белок	MSMEG_0643	436	68%	1	9	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0683	185	96%	N/D	66	цитоплазма

Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0692	184	55%	N/D	142	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0692	80	44%	N/D	65	мембраны
Вегетативные	монооксигеназа	MSMEG_0702	278	98%	19	31	цитоплазма
Покоящиеся	монооксигеназа	MSMEG_0702	250	87%	19	31	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0703	227	76%	106	N/D	мембраны
Вегетативные	шаперонный белок DnaK	MSMEG_0709	439	72%	16	14	цитоплазма
Вегетативные	шаперонный белок DnaK	MSMEG_0709	701	78%	18	28	мембраны
Покоящиеся	шаперонный белок DnaK	MSMEG_0709	481	68%	16	14	цитоплазма
Покоящиеся	шаперонный белок DnaK	MSMEG_0709	552	83%	18	28	мембраны
Вегетативные	ко-шаперон GrpE	MSMEG_0710	141	89%	N/D	36	цитоплазма
Вегетативные	белок подсемейства альдоза-1-эпимераза	MSMEG_0717	133	85%	N/D	69	цитоплазма
Покоящиеся	шаперон ClpB	MSMEG_0732	443	65%	122	N/D	мембраны
Покоящиеся	фруктозо-бисфосфатальдолаза, класс II	MSMEG_0752	206	65%	125	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0753	196	74%	N/D	84	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0768	110	88%	30	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок суперсемейства металло-бета-актламаз	MSMEG_0775	246	72%	N/D	39	мембраны
Вегетативные	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	MSMEG_0777	395	89%	13	115	цитоплазма
Вегетативные	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	MSMEG_0777	90	61%	N/D	75	мембраны
Покоящиеся	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	MSMEG_0777	369	83%	13	115	цитоплазма
Вегетативные	тиамин-фосфатпиروفосфорилаза	MSMEG_0789	137	84%	N/D	77	цитоплазма
Вегетативные	ABC транспортер АТФ-связывающий белок	MSMEG_0795	287	86%	N/D	42	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_0806	386	88%	N/D	103	мембраны
Вегетативные	пептид деформилаза	MSMEG_0832	64	46%	N/D	111	мембраны
Вегетативные	медь / цинк супероксиддисмутаза	MSMEG_0835	146	66%	26	7	мембраны
Покоящиеся	медь / цинк супероксиддисмутаза	MSMEG_0835	82	34%	26	7	мембраны
Вегетативные	Белок контроля деления клеток Cdc48	MSMEG_0858	389	65%	N/D	146	цитоплазма
Вегетативные	регулятор транскрипции, белок семейства TetR	MSMEG_0859	177	36%	103	85	цитоплазма
Покоящиеся	регулятор транскрипции, белок семейства TetR	MSMEG_0859	218	36%	103	85	цитоплазма
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_0867	124	76%	N/D	36	цитоплазма

Веgetативные	шаперонин GroL	MSMEG_0880	343	74%	64	62	цитоплазма
Веgetативные	шаперонин GroL	MSMEG_0880	409	78%	63	6	мембраны
Покоящиеся	шаперонин GroL	MSMEG_0880	299	63%	64	62	цитоплазма
Покоящиеся	шаперонин GroL	MSMEG_0880	55	31%	63	6	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0887	79	51%	143	N/D	цитоплазма
Веgetативные	дигидролипоамиддегидрогеназа	MSMEG_0903	203	60%	50	116	мембраны
Покоящиеся	дигидролипоамиддегидрогеназа	MSMEG_0903	503	92%	50	116	мембраны
Покоящиеся	3-гидроксibuтирил-KoA дегидрогеназа	MSMEG_0912	183	72%	120	N/D	цитоплазма
Веgetативные	синтаза метоксимиколоиновой кислоты 1	MSMEG_0913	257	85%	N/D	20	мембраны
Покоящиеся	гепарин-связывающий гемагглютинин	MSMEG_0919	176	46%	24	N/D	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0923	201	66%	N/D	98	мембраны
Веgetативные	Белки семейства ErfK / YbiS / YcfS / YnhG	MSMEG_0929	164	58%	119	37	мембраны
Покоящиеся	Белки семейства ErfK / YbiS / YcfS / YnhG	MSMEG_0929	76	45%	119	37	мембраны
Веgetативные	2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицератмутаза	MSMEG_0935	106	69%	75	77	цитоплазма
Покоящиеся	2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицератмутаза	MSMEG_0935	160	63%	75	77	цитоплазма
Покоящиеся	2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицератмутаза	MSMEG_0935	99	58%	92	N/D	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0938	50	33%	N/D	30	мембраны
Веgetативные	HAD-суперсемейство белков подсемейства белков IB гидролаза, TIGR01490	MSMEG_0949	82	46%	N/D	119	мембраны
Покоящиеся	порфобилиноген дезаминаза	MSMEG_0953	86	55%	93	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	дегидратаза дельта-аминолевулиновой кислоты	MSMEG_0956	120	53%	136	N/D	цитоплазма
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0971	224	63%	62	93	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_0971	221	72%	62	93	мембраны
Веgetативные	геранилгеранилредуктаза	MSMEG_1028	208	52%	N/D	13	мембраны
Веgetативные	алкогольдегидрогеназа, цинкoдержашая	MSMEG_1037	113	77%	20	19	цитоплазма
Покоящиеся	алкогольдегидрогеназа, цинкoдержашая	MSMEG_1037	107	71%	20	19	цитоплазма
Веgetативные	Периплазматический связывающий белок	MSMEG_1039	197	81%	99	35	мембраны
Покоящиеся	Периплазматический связывающий белок	MSMEG_1039	144	81%	99	35	мембраны
Веgetативные	Молибденовая транспортная система типа ABC, АТФазный компонент	MSMEG_1046	57	54%	N/D	20	мембраны

Вегетативные	еноил-KoA гидратаза	MSMEG_1048	191	86%	N/D	94	цитоплазма
Вегетативные	метилтрансфераза, белок семейства UbiE / COQ5	MSMEG_1049	90	73%	N/D	16	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1053	281	67%	84	83	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1053	321	77%	84	83	мембраны
Покоящиеся	гидролаза	MSMEG_1078	91	48%	122	N/D	цитоплазма
Вегетативные	амидаза	MSMEG_1090	259	91%	N/D	91	цитоплазма
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_1108	93	40%	N/D	72	мембраны
Покоящиеся	Периплазматический субстрат-связывающий белок периплазматической транспортной системы типа ABC	MSMEG_1216	307	76%	98	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1247	200	50%	N/D	34	мембраны
Вегетативные	фактор высвобождения пептидной цепи 3	MSMEG_1316	487	88%	N/D	24	мембраны
Покоящиеся	белок семейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_1334	80	77%	37	N/D	мембраны
Покоящиеся	Белок семейства MaoC	MSMEG_1341	254	93%	25	N/D	мембраны
Вегетативные	белок антитерминации транскрипции NusG	MSMEG_1345	255	67%	N/D	80	цитоплазма
Покоящиеся	белок антитерминации транскрипции NusG	MSMEG_1345	81	46%	132	N/D	мембраны
Вегетативные	50S рибосомный белок L10	MSMEG_1364	406	80%	30	14	мембраны
Покоящиеся	50S рибосомный белок L10	MSMEG_1364	211	56%	30	14	мембраны
Покоящиеся	рибосомный белок L7 / L12	MSMEG_1365	211	92%	25	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	рибосомный белок L7 / L12	MSMEG_1365	274	93%	12	N/D	мембраны
Покоящиеся	ДНК-направленная РНК-полимераза, бета-субъединица	MSMEG_1367	128	27%	51	N/D	мембраны
Вегетативные	транспортер рибозы ABC, периплазматический связывающий белок	MSMEG_1374	147	67%	N/D	48	мембраны
Вегетативные	алкогольдегидрогеназа, класс IV	MSMEG_1392	339	88%	N/D	48	цитоплазма
Вегетативные	алкогольдегидрогеназа, класс IV	MSMEG_1392	79	39%	N/D	77	мембраны
Вегетативные	фактор элонгации Tu	MSMEG_1401	419	89%	5	21	мембраны
Покоящиеся	фактор элонгации Tu	MSMEG_1401	358	77%	70	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	фактор элонгации Tu	MSMEG_1401	415	84%	5	21	мембраны
Вегетативные	FMN-зависимая дегидрогеназа	MSMEG_1424	287	71%	71	5	мембраны
Покоящиеся	FMN-зависимая дегидрогеназа	MSMEG_1424	78	42%	71	5	мембраны
Вегетативные	50S рибосомный белок L5	MSMEG_1467	73	41%	N/D	8	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1475	366	85%	151	N/D	цитоплазма

Вегетативные	сигнальная пептидная пептидаза SppA, тип 67K	MSMEG_1476	314	57%	N/D	67	мембраны
Вегетативные	аденилаткиназа	MSMEG_1484	156	56%	N/D	68	цитоплазма
Вегетативные	метионинаминопептидаза, тип I	MSMEG_1485	98	57%	N/D	92	мембраны
Покоящиеся	метилмалонат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_1498	266	78%	80	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1513	106	65%	116	N/D	цитоплазма
Вегетативные	тиоредоксинредуктаза	MSMEG_1516	100	47%	N/D	3	мембраны
Вегетативные	ДНК-направленная РНК-полимераза, альфа-субъединица	MSMEG_1524	186	76%	N/D	28	цитоплазма
Вегетативные	ДНК-направленная РНК-полимераза, альфа-субъединица	MSMEG_1524	407	95%	26	58	мембраны
Покоящиеся	ДНК-направленная РНК-полимераза, альфа-субъединица	MSMEG_1524	466	92%	26	58	мембраны
Вегетативные	50S рибосомный белок L17	MSMEG_1525	202	70%	14	32	мембраны
Покоящиеся	50S рибосомный белок L17	MSMEG_1525	244	67%	14	32	мембраны
Вегетативные	альдегиддегидрогеназа	MSMEG_1543	187	64%	N/D	98	цитоплазма
Вегетативные	шаперонин GroL	MSMEG_1583	146	59%	N/D	3	мембраны
Вегетативные	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа	MSMEG_1602	396	79%	79	57	цитоплазма
Покоящиеся	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа	MSMEG_1602	217	74%	79	57	цитоплазма
Покоящиеся	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа	MSMEG_1602	318	71%	45	N/D	мембраны
Вегетативные	Белок семейства IMP дегидрогеназы	MSMEG_1603	79	68%	33	19	цитоплазма
Покоящиеся	Белок семейства IMP дегидрогеназы	MSMEG_1603	106	74%	33	19	цитоплазма
Покоящиеся	ГМФ-синтаза, гидролизующая глутамин	MSMEG_1610	257	67%	62	N/D	цитоплазма
Вегетативные	тетрагидрофолатдегидрогеназа / циклогидролаза FOLD	MSMEG_1647	340	90%	N/D	123	цитоплазма
Вегетативные	О-ацетилгомосерин сульфгидрилаза	MSMEG_1652	247	97%	85	24	цитоплазма
Покоящиеся	О-ацетилгомосерин сульфгидрилаза	MSMEG_1652	176	95%	85	24	цитоплазма
Вегетативные	изоцитратдегидрогеназа, НАДФ-зависимая	MSMEG_1654	201	64%	54	1	мембраны
Покоящиеся	изоцитратдегидрогеназа, НАДФ-зависимая	MSMEG_1654	484	73%	65	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	изоцитратдегидрогеназа, НАДФ-зависимая	MSMEG_1654	170	49%	54	1	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_1655	87	72%	24	9	мембраны
Покоящиеся	гидролаза	MSMEG_1655	96	63%	24	9	мембраны
Вегетативные	оксидоредуктаза, белок семейства 2-нитропропандиоксигеназ	MSMEG_1660	73	47%	N/D	147	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства альдегиддегидрогеназ (НАД)	MSMEG_1665	273	77%	N/D	97	цитоплазма

Вегетативные	сукцинатдегидрогеназа, субъединица флавопротеина	MSMEG_1670	66	42%	N/D	24	мембраны
Покоящиеся	сукцинатдегидрогеназа, субъединица флавопротеина	MSMEG_1670	309	44%	130	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	аденозиндезаминаза	MSMEG_1676	353	80%	145	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1680	172	83%	N/D	53	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1684	320	74%	N/D	120	цитоплазма
Вегетативные	урацил фосфорибозилтрансфераза	MSMEG_1694	120	87%	N/D	117	цитоплазма
Вегетативные	дигидролипоамиддегидрогеназа	MSMEG_1735	333	73%	N/D	111	цитоплазма
Покоящиеся	дегидрогеназа пиперидин-6-карбоновой кислоты	MSMEG_1762	207	56%	77	N/D	цитоплазма
Вегетативные	альфа-цепь ацетил- / пропионил-кофермента А карбоксилазы	MSMEG_1807	283	73%	103	75	мембраны
Покоящиеся	альфа-цепь ацетил- / пропионил-кофермента А карбоксилазы	MSMEG_1807	345	72%	146	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	альфа-цепь ацетил- / пропионил-кофермента А карбоксилазы	MSMEG_1807	595	86%	103	75	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая тиосульфат-серотрансфераза	MSMEG_1809	212	84%	17	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	бета-цепь пропионил-КоА карбоксилазы	MSMEG_1813	273	91%	51	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_1821	124	64%	21	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	2-фосфо-l-лактаттрансфераза	MSMEG_1830	200	83%	52	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Регулятор ДНК-связывающего MtrA	MSMEG_1874	183	75%	71	57	мембраны
Покоящиеся	Регулятор ДНК-связывающего MtrA	MSMEG_1874	236	71%	71	57	мембраны
Покоящиеся	Белок LpqB	MSMEG_1876	82	39%	38	N/D	мембраны
Вегетативные	Белок семейства S30AE	MSMEG_1878	159	76%	19	23	мембраны
Покоящиеся	Белок семейства S30AE	MSMEG_1878	351	73%	19	23	мембраны
Вегетативные	препротеин-транслоказа, субъединица SecA	MSMEG_1881	608	73%	N/D	36	мембраны
Вегетативные	Белок связывающего домена кластера железа и серы 2Fe-2S	MSMEG_1885	98	39%	N/D	13	мембраны
Вегетативные	3-фосфошикимат 1-карбоксивинилтрансфераза	MSMEG_1890	251	81%	N/D	119	цитоплазма
Вегетативные	диацилглицеринкиназа	MSMEG_1920	78	43%	N/D	54	мембраны
Вегетативные	Геликаза	MSMEG_1930	103	27%	N/D	110	мембраны
Покоящиеся	Белок семейства ABC1	MSMEG_1954	278	67%	56	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1957	82	36%	23	79	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_1957	351	69%	23	79	мембраны

Веgetативные	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_2026	264	85%	72	44	цитоплазма
Покоящиеся	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_2026	60	53%	72	44	цитоплазма
Веgetативные	оксидоредуктаза	MSMEG_2033	151	71%	17	32	цитоплазма
Покоящиеся	оксидоредуктаза	MSMEG_2033	115	71%	17	32	цитоплазма
Веgetативные	антиген 85-С	MSMEG_2078	125	59%	97	15	цитоплазма
Покоящиеся	антиген 85-С	MSMEG_2078	124	53%	97	15	цитоплазма
Веgetативные	алкогольдегидрогеназа	MSMEG_2079	341	92%	119	2	цитоплазма
Веgetативные	алкогольдегидрогеназа	MSMEG_2079	290	87%	19	61	мембраны
Покоящиеся	алкогольдегидрогеназа	MSMEG_2079	273	75%	119	2	цитоплазма
Покоящиеся	алкогольдегидрогеназа	MSMEG_2079	362	93%	19	61	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_2080	133	76%	57	N/D	мембраны
Веgetативные	предполагаемая ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_2081	153	42%	109	108	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_2081	388	66%	109	108	мембраны
Веgetативные	АТФ-связывающий белок деления клеток FtsE	MSMEG_2089	77	45%	N/D	17	мембраны
Покоящиеся	D-аминопептидаза	MSMEG_2092	83	42%	116	N/D	цитоплазма
Веgetативные	дигидроксиацетонкиназа, субъединица L	MSMEG_2122	171	93%	N/D	46	цитоплазма
Покоящиеся	дигидроксиацетонкиназа, субъединица DhaK	MSMEG_2123	126	52%	136	N/D	цитоплазма
Веgetативные	фосфоглюкомутаза	MSMEG_2136	428	78%	N/D	90	цитоплазма
Веgetативные	ZbpA белок	MSMEG_2201	161	90%	50	76	цитоплазма
Покоящиеся	ZbpA белок	MSMEG_2201	229	91%	50	76	цитоплазма
Веgetативные	гипотетический белок	MSMEG_2261	83	39%	N/D	81	мембраны
Веgetативные	гидрогеназа-2, большая субъединица	MSMEG_2263	198	58%	10	19	мембраны
Покоящиеся	гидрогеназа-2, большая субъединица	MSMEG_2263	477	88%	10	19	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2350	63	40%	N/D	48	мембраны
Веgetативные	электрон-переносящий флавопротеин, бета-субъединица	MSMEG_2351	287	77%	14	12	цитоплазма
Веgetативные	электрон-переносящий флавопротеин, бета-субъединица	MSMEG_2351	410	84%	6	26	мембраны
Покоящиеся	электрон-переносящий флавопротеин, бета-субъединица	MSMEG_2351	365	87%	14	12	цитоплазма
Покоящиеся	электрон-переносящий флавопротеин, бета-субъединица	MSMEG_2351	523	96%	6	26	мембраны
Веgetативные	электрон-переносящий флавопротеин, альфа - субъединица	MSMEG_2352	336	92%	18	6	цитоплазма

Вегетативные	электрон-переносающий флавопротеин, альфа - субъединица	MSMEG_2352	315	81%	8	25	мембраны
Покоящиеся	электрон-переносающий флавопротеин, альфа - субъединица	MSMEG_2352	361	94%	18	6	цитоплазма
Покоящиеся	электрон-переносающий флавопротеин, альфа - субъединица	MSMEG_2352	398	95%	8	25	мембраны
Покоящиеся	секретируемый белок	MSMEG_2353	150	56%	133	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	тРНК (5-метиламнометил-2-тиоуридилат) - метилтрансфераза	MSMEG_2358	92	59%	134	N/D	мембраны
Вегетативные	метионинсинтаза, независимая от витамина B12	MSMEG_2359	45	62%	N/D	41	мембраны
Вегетативные	субъединица А глутамил-тРНК (Gln) амидотрансферазы	MSMEG_2365	243	62%	N/D	67	цитоплазма
Вегетативные	субъединица В аспартил / глутамил-тРНК (Asn / Gln) амидотрансферазы	MSMEG_2367	155	59%	44	60	цитоплазма
Вегетативные	субъединица В аспартил / глутамил-тРНК (Asn / Gln) амидотрансферазы	MSMEG_2367	131	51%	N/D	15	мембраны
Покоящиеся	субъединица В аспартил / глутамил-тРНК (Asn / Gln) амидотрансферазы	MSMEG_2367	182	66%	44	60	цитоплазма
Покоящиеся	субъединица В аспартил / глутамил-тРНК (Asn / Gln) амидотрансферазы	MSMEG_2367	91	34%	N/D	15	мембраны
Вегетативные	Белок LppZ	MSMEG_2369	241	52%	N/D	80	мембраны
Вегетативные	Белок LppZ	MSMEG_2369	100	37%	N/D	80	мембраны
Вегетативные	ацетолактатсинтаза, большая субъединица, биосинтетический тип	MSMEG_2372	108	55%	64	24	мембраны
Покоящиеся	ацетолактатсинтаза, большая субъединица, биосинтетический тип	MSMEG_2372	354	64%	64	24	мембраны
Покоящиеся	редуктоизомераза кетоловой кислоты	MSMEG_2374	206	62%	70	N/D	мембраны
Вегетативные	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа	MSMEG_2378	354	78%	N/D	43	цитоплазма
Вегетативные	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа	MSMEG_2378	115	53%	10	19	мембраны
Покоящиеся	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа	MSMEG_2378	359	93%	10	19	мембраны
Вегетативные	5-карбоксиметил-2-гидроксимуконат дельта-изомераза	MSMEG_2382	90	67%	N/D	47	цитоплазма
Покоящиеся	полифосфаткиназа	MSMEG_2391	574	89%	111	N/D	цитоплазма
Вегетативные	D-аланин - D-аланин-лигаза	MSMEG_2395	100	50%	N/D	63	цитоплазма
Покоящиеся	D-аланин - D-аланин-лигаза	MSMEG_2395	105	56%	57	N/D	мембраны
Вегетативные	урацил-ДНК гликозилаза	MSMEG_2399	146	60%	N/D	45	мембраны
Вегетативные	морфин-6-дегидрогеназа	MSMEG_2407	248	99%	N/D	74	цитоплазма
Вегетативные	2,5-дикето-D-глюконовая кислота редуктаза А	MSMEG_2408	209	89%	72	17	цитоплазма

Покоящиеся	2,5-дикето-D-глюконовая кислота редуктаза A	MSMEG_2408	140	80%	72	17	цитоплазма
Покоящиеся	2,5-дикето-D-глюконовая кислота редуктаза A	MSMEG_2408	95	54%	42	N/D	мембраны
Вегетативные	белок семейства альфа / бета гидролаз	MSMEG_2409	220	77%	60	100	мембраны
Покоящиеся	белок семейства альфа / бета гидролаз	MSMEG_2409	63	59%	60	100	мембраны
Вегетативные	предполагаемая серин-треониновая протеинкиназа	MSMEG_2410	94	51%	N/D	32	мембраны
Покоящиеся	пируваткарбоксилаза	MSMEG_2412	451	75%	118	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок-стыковочный элемент для распознавания сигнала FtsY	MSMEG_2424	165	53%	49	69	мембраны
Покоящиеся	белок-стыковочный элемент для распознавания сигнала FtsY	MSMEG_2424	93	31%	49	69	мембраны
Вегетативные	30S рибосомный белок S16	MSMEG_2435	284	82%	11	8	мембраны
Покоящиеся	30S рибосомный белок S16	MSMEG_2435	172	80%	11	8	мембраны
Вегетативные	белок семейства диенелахтонгидролаз	MSMEG_2444	57	39%	N/D	14	мембраны
Покоящиеся	метилмалонат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_2449	207	72%	29	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	аденозилметионин - 8-амино-7- оксоноаноаттрансаминаза	MSMEG_2450	334	84%	115	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	HAD-суперсемейство протеин гидролаза, подсемейство протеин IIA	MSMEG_2451	92	54%	14	N/D	цитоплазма
Вегетативные	гипотетический белок	MSMEG_2458	221	73%	N/D	127	мембраны
Покоящиеся	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_2488	273	57%	153	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства амидаз	MSMEG_2497	240	76%	N/D	125	цитоплазма
Покоящиеся	белок утилизации сидерофоров	MSMEG_2511	209	55%	138	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	предполагаемая оксидоредуктаза	MSMEG_2516	185	73%	116	N/D	цитоплазма
Вегетативные	рибосомный белок S2	MSMEG_2519	315	93%	27	49	мембраны
Покоящиеся	рибосомный белок S2	MSMEG_2519	106	71%	27	49	мембраны
Вегетативные	Ts фактор элонгации	MSMEG_2520	270	76%	72	17	цитоплазма
Вегетативные	Ts фактор элонгации	MSMEG_2520	91	29%	42	106	мембраны
Покоящиеся	Ts фактор элонгации	MSMEG_2520	430	89%	72	17	цитоплазма
Покоящиеся	Ts фактор элонгации	MSMEG_2520	78	42%	42	106	мембраны
Вегетативные	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфатредуктоизомераза	MSMEG_2578	200	83%	N/D	132	цитоплазма
Покоящиеся	гамма-глутамил изопропиламидсинтаза	MSMEG_2595	65	46%	61	N/D	цитоплазма
Вегетативные	альдегиддегидрогеназа	MSMEG_2597	195	70%	1	79	цитоплазма

Покоящиеся	альдегиддегидрогеназа	MSMEG_2597	115	67%	1	79	цитоплазма
Покоящиеся	альдегиддегидрогеназа	MSMEG_2597	124	63%	35	N/D	мембраны
Вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_2598	138	71%	N/D	106	цитоплазма
Вегетативные	малат: хинон-оксидоредуктаза	MSMEG_2613	218	56%	93	10	мембраны
Покоящиеся	малат: хинон-оксидоредуктаза	MSMEG_2613	351	83%	93	10	мембраны
Покоящиеся	Белок ElaA	MSMEG_2614	94	54%	101	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	пролил-тРНК синтетаза	MSMEG_2621	524	93%	35	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2624	76	71%	N/D	100	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2624	277	87%	66	31	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2624	118	73%	66	31	мембраны
Покоящиеся	фактор терминации транскрипции NusA	MSMEG_2625	59	44%	27	N/D	мембраны
Вегетативные	еноил-КоА гидратаза	MSMEG_2641	177	74%	N/D	105	цитоплазма
Вегетативные	Фосфопантетеинилтрансфераза sfr-типа	MSMEG_2648	82	66%	N/D	101	цитоплазма
Покоящиеся	Фосфопантетеинилтрансфераза sfr-типа	MSMEG_2648	133	75%	69	N/D	мембраны
Вегетативные	гуанозинпентафосфатсинтетаза I / полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза	MSMEG_2656	413	68%	49	99	мембраны
Покоящиеся	гуанозинпентафосфатсинтетаза I / полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза	MSMEG_2656	345	74%	23	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	гуанозинпентафосфатсинтетаза I / полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза	MSMEG_2656	356	51%	49	99	мембраны
Вегетативные	аланиндегидрогеназа	MSMEG_2659	248	84%	3	70	цитоплазма
Покоящиеся	аланиндегидрогеназа	MSMEG_2659	474	95%	3	70	цитоплазма
Покоящиеся	аланиндегидрогеназа	MSMEG_2659	366	83%	27	N/D	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_2669	140	75%	N/D	36	цитоплазма
Вегетативные	дигидродипиколонатсинтаза	MSMEG_2684	275	70%	N/D	56	цитоплазма
Покоящиеся	белок суперсемейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_2685	398	75%	121	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Белок 35 кДа	MSMEG_2695	315	92%	5	43	мембраны
Покоящиеся	Белок 35 кДа	MSMEG_2695	410	97%	5	43	мембраны
Вегетативные	Белок RecA	MSMEG_2723	160	67%	N/D	22	мембраны
Вегетативные	глутамат-связывающий белок	MSMEG_2727	174	57%	N/D	137	цитоплазма
Вегетативные	глутамат-связывающий белок	MSMEG_2727	352	70%	9	24	мембраны

Покоящиеся	глутамат-связывающий белок	MSMEG_2727	543	84%	9	24	мембраны
Вегетативные	транспорт глутамата АТФ-связывающий белок GluA	MSMEG_2728	47	36%	N/D	62	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2739	329	67%	61	65	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2739	320	57%	61	65	мембраны
Покоящиеся	тимидилатсинтаза	MSMEG_2744	252	74%	60	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	тимидилатсинтаза	MSMEG_2744	85	57%	37	N/D	мембраны
Покоящиеся	сигма-фактор SigB	MSMEG_2752	55	22%	71	5	мембраны
Вегетативные	дезоксисуридин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза	MSMEG_2765	198	84%	N/D	58	цитоплазма
Вегетативные	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза	MSMEG_2776	94	41%	N/D	68	мембраны
Покоящиеся	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза	MSMEG_2776	570	81%	117	N/D	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_2777	141	54%	N/D	69	мембраны
Покоящиеся	уропорфириноген декарбоксилаза	MSMEG_2780	155	60%	149	N/D	цитоплазма
Вегетативные	метионин-R-сульфоксидредуктаза	MSMEG_2784	55	59%	N/D	85	цитоплазма
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_2786	283	67%	N/D	121	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_2913	82	48%	N/D	61	мембраны
Покоящиеся	2-дегидропантоат 2-редуктаза	MSMEG_2919	122	47%	71	N/D	мембраны
Вегетативные	глицин бетаин / карнитин / транспорт холина АТФ-связывающий белок opuCA	MSMEG_2926	70	56%	N/D	16	мембраны
Покоящиеся	глицин бетаин / карнитин / транспорт холина АТФ-связывающий белок opuCA	MSMEG_2926	94	71%	60	N/D	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_2936	132	47%	N/D	86	мембраны
Вегетативные	белок биосинтеза пиридоксина	MSMEG_2937	236	86%	N/D	61	цитоплазма
Покоящиеся	ацил-CoA тиаэстераза II	MSMEG_2938	79	46%	98	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2940	82	78%	128	N/D	цитоплазма
Вегетативные	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества	MSMEG_2963	227	61%	37	18	мембраны
Покоящиеся	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества	MSMEG_2963	384	80%	37	18	мембраны
Вегетативные	гистидил-тРНК синтаза	MSMEG_2976	92	49%	N/D	26	мембраны
Покоящиеся	гистидил-тРНК синтаза	MSMEG_2976	68	53%	60	N/D	мембраны
Вегетативные	предполагаемый периплазматический связывающий белок	MSMEG_2982	279	54%	N/D	68	мембраны

Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_2983	72	72%	N/D	30	цитоплазма
Веgetативные	гидролаза	MSMEG_2984	91	67%	N/D	35	мембраны
Покоящиеся	аланил-тРНК синтетаза	MSMEG_3025	263	76%	40	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	хоризмат-синтаза	MSMEG_3030	358	93%	47	N/D	цитоплазма
Веgetативные	3-дегидрохинатсинтаза	MSMEG_3033	175	81%	12	22	мембраны
Покоящиеся	3-дегидрохинатсинтаза	MSMEG_3033	112	71%	12	22	мембраны
Веgetативные	тиопурин S-метилтрансфераза (tpmt)	MSMEG_3041	145	81%	N/D	135	цитоплазма
Веgetативные	карбамоилфосфатсинтаза, малая субъединица	MSMEG_3046	97	64%	N/D	47	мембраны
Веgetативные	S-аденозилметионинсинтетаза	MSMEG_3055	363	88%	88	34	цитоплазма
Покоящиеся	S-аденозилметионинсинтетаза	MSMEG_3055	419	90%	88	34	цитоплазма
Веgetативные	ABC транспортер АТФ-связывающий белок	MSMEG_3056	238	54%	N/D	71	мембраны
Покоящиеся	липопротеин, белок семейства plra	MSMEG_3058	65	49%	67	N/D	мембраны
Веgetативные	эстераза	MSMEG_3059	141	95%	N/D	21	цитоплазма
Покоящиеся	эстераза	MSMEG_3059	118	43%	26	N/D	мембраны
Покоящиеся	метионил-тРНК формилтрансфераза	MSMEG_3064	107	64%	66	N/D	мембраны
Веgetативные	рибулозо-фосфат-3-эпимераза	MSMEG_3066	137	56%	N/D	128	цитоплазма
Веgetативные	Белок LprG	MSMEG_3070	213	76%	3	7	мембраны
Покоящиеся	Белок LprG	MSMEG_3070	156	50%	3	7	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3079	123	55%	N/D	67	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3079	106	68%	58	N/D	мембраны
Веgetативные	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, тип I	MSMEG_3084	155	76%	7	1	цитоплазма
Веgetативные	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, тип I	MSMEG_3084	241	81%	13	37	мембраны
Покоящиеся	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, тип I	MSMEG_3084	180	80%	7	1	цитоплазма
Покоящиеся	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, тип I	MSMEG_3084	299	88%	13	37	мембраны
Веgetативные	фосфоглицераткиназа	MSMEG_3085	377	92%	2	39	цитоплазма
Покоящиеся	фосфоглицераткиназа	MSMEG_3085	427	82%	2	39	цитоплазма
Веgetативные	триозофосфат изомеразы	MSMEG_3086	255	97%	57	113	цитоплазма
Покоящиеся	триозофосфат изомеразы	MSMEG_3086	252	86%	57	113	цитоплазма
Веgetативные	D-рибоза-связывающий периплазматический белок	MSMEG_3095	149	75%	N/D	17	мембраны

Покоящиеся	6-фосфоглюконолактоназа	MSMEG_3099	210	64%	96	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Белок OpcA	MSMEG_3100	309	92%	17	32	цитоплазма
Покоящиеся	Белок OpcA	MSMEG_3100	81	53%	17	32	цитоплазма
Покоящиеся	трансальдолаза	MSMEG_3102	193	70%	34	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	транскетолаза	MSMEG_3103	366	68%	9	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	транскетолаза	MSMEG_3103	129	52%	108	N/D	мембраны
Вегетативные	хинон оксидоредуктаза	MSMEG_3106	298	88%	15	37	цитоплазма
Вегетативные	хинон оксидоредуктаза	MSMEG_3106	91	42%	59	51	мембраны
Покоящиеся	хинон оксидоредуктаза	MSMEG_3106	157	89%	15	37	цитоплазма
Покоящиеся	хинон оксидоредуктаза	MSMEG_3106	278	91%	59	51	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3107	272	82%	N/D	51	мембраны
Вегетативные	АТФаза SufC	MSMEG_3124	289	91%	N/D	30	мембраны
Покоящиеся	цистеин десульфурaza	MSMEG_3125	99	47%	46	N/D	мембраны
Вегетативные	аконитатгидратаза 1	MSMEG_3143	398	62%	4	16	цитоплазма
Покоящиеся	аконитатгидратаза 1	MSMEG_3143	471	60%	4	16	цитоплазма
Покоящиеся	аконитатгидратаза 1	MSMEG_3143	473	72%	34	N/D	мембраны
Вегетативные	АТФаза, белок семейства MoxR	MSMEG_3147	481	89%	N/D	143	цитоплазма
Вегетативные	АТФаза, белок семейства MoxR	MSMEG_3147	277	79%	60	21	мембраны
Покоящиеся	АТФаза, белок семейства MoxR	MSMEG_3147	323	66%	60	21	мембраны
Вегетативные	[НАДН] еноил- [ацил-белок-носитель] редуктаза	MSMEG_3151	376	93%	N/D	38	цитоплазма
Вегетативные	[НАДН] еноил- [ацил-белок-носитель] редуктаза	MSMEG_3151	212	69%	31	56	мембраны
Покоящиеся	[НАДН] еноил- [ацил-белок-носитель] редуктаза	MSMEG_3151	167	55%	31	56	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3153	120	75%	26	N/D	мембраны
Покоящиеся	метилмалонил-KoA мутаза, малая субъединица	MSMEG_3158	96	26%	33	N/D	мембраны
Покоящиеся	L-аспарагиназа	MSMEG_3173	90	37%	96	N/D	мембраны
Покоящиеся	фермент разветвления гликогена GlgX	MSMEG_3186	142	44%	107	N/D	цитоплазма
Вегетативные	бифункциональный белок HisA / TrpF	MSMEG_3209	220	80%	N/D	104	цитоплазма
Покоящиеся	антранилатсинтаза компонент I	MSMEG_3217	177	58%	61	N/D	цитоплазма
Вегетативные	индол-3-глицеринфосфатсинтаза	MSMEG_3219	276	87%	N/D	101	цитоплазма

Покоящиеся	индол-3-глицеринфосфатсинтаза	MSMEG_3219	105	44%	69	N/D	мембраны
Покоящиеся	пируваткиназа	MSMEG_3227	327	85%	6	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	пируваткиназа	MSMEG_3227	164	73%	102	N/D	мембраны
Вегетативные	Система транспорта аминокислот ABC-типа, секретрируемый компонент	MSMEG_3235	201	79%	20	17	мембраны
Покоящиеся	Система транспорта аминокислот ABC-типа, секретрируемый компонент	MSMEG_3235	122	58%	20	17	мембраны
Вегетативные	ABC-транспортер аминокислот с разветвленной цепью, субстрат-связывающий белок	MSMEG_3247	239	62%	16	5	мембраны
Покоящиеся	ABC-транспортер аминокислот с разветвленной цепью, субстрат-связывающий белок	MSMEG_3247	393	71%	16	5	мембраны
Вегетативные	ABC транспортер, АТФ-связывающий белок	MSMEG_3250	64	45%	N/D	23	мембраны
Вегетативные	ABC-транспортер аминокислот с разветвленной цепью, АТФ -связывающий белок	MSMEG_3251	92	53%	N/D	17	мембраны
Вегетативные	регулятор транскрипции	MSMEG_3264	73	66%	N/D	75	мембраны
Покоящиеся	арабитолфосфатдегидрогеназа	MSMEG_3265	153	72%	127	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	мальтоза / мальтодекстрин-связывающий белок	MSMEG_3266	222	68%	120	N/D	мембраны
Вегетативные	полиаминсвязывающий липопротеин	MSMEG_3280	169	67%	99	35	мембраны
Покоящиеся	полиаминсвязывающий липопротеин	MSMEG_3280	147	66%	99	35	мембраны
Покоящиеся	регулятор транскрипции, белок семейства IclR	MSMEG_3335	111	56%	76	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок TIGR00026	MSMEG_3356	105	83%	N/D	64	цитоплазма
Вегетативные	гипотетический белок	MSMEG_3419	99	43%	N/D	92	мембраны
Покоящиеся	гипотетический белок	MSMEG_3419	121	57%	125	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	гипотетический белок	MSMEG_3419	63	40%	67	N/D	мембраны
Покоящиеся	каталаза / пероксидаза HPI	MSMEG_3461	363	73%	10	N/D	цитоплазма
Вегетативные	тиолпероксидаза	MSMEG_3479	164	97%	38	7	цитоплазма
Покоящиеся	тиолпероксидаза	MSMEG_3479	120	85%	38	7	цитоплазма
Вегетативные	фруктозо-бисфосфатальдолаза I класса	MSMEG_3507	374	93%	45	11	цитоплазма
Покоящиеся	фруктозо-бисфосфатальдолаза I класса	MSMEG_3507	302	87%	45	11	цитоплазма
Покоящиеся	гипотетический белок	MSMEG_3545	118	42%	95	N/D	цитоплазма
Вегетативные	антранилат диоксигеназа редуктаза	MSMEG_3594	375	90%	93	116	цитоплазма
Покоящиеся	антранилат диоксигеназа редуктаза	MSMEG_3594	310	97%	93	116	цитоплазма

Вегетативные	периплазматический сахар-связывающий белок	MSMEG_3598	186	80%	75	22	мембраны
Покоящиеся	периплазматический сахар-связывающий белок	MSMEG_3598	311	98%	75	22	мембраны
Вегетативные	сахар-связывающий регулятор транскрипции, белок семейства LacI	MSMEG_3599	167	72%	N/D	150	цитоплазма
Покоящиеся	сахар-связывающий регулятор транскрипции, белок семейства LacI	MSMEG_3599	269	62%	68	N/D	мембраны
Покоящиеся	сорбитолдегидрогеназа	MSMEG_3605	105	73%	100	N/D	цитоплазма
Вегетативные	секретируемый белок, богатый аланином и пролином	MSMEG_3618	178	59%	N/D	126	мембраны
Покоящиеся	секретируемый белок, богатый аланином и пролином	MSMEG_3618	145	47%	152	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	секретируемый белок, богатый аланином и пролином	MSMEG_3618	123	46%	59	N/D	мембраны
Вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_3619	167	87%	N/D	73	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3620	262	91%	15	59	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3620	144	52%	15	59	цитоплазма
Покоящиеся	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирование	MSMEG_3632	195	72%	8	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирование	MSMEG_3632	463	75%	110	N/D	мембраны
Вегетативные	Белок семейства IMP-дегидрогеназ	MSMEG_3634	391	83%	39	144	цитоплазма
Покоящиеся	Белок семейства IMP-дегидрогеназ	MSMEG_3634	263	84%	39	144	цитоплазма
Вегетативные	периплазматический белок, связывающий трехвалентное железо, транспортер ABC	MSMEG_3636	167	51%	N/D	85	мембраны
Вегетативные	малатсинтаза G	MSMEG_3640	369	69%	11	130	цитоплазма
Покоящиеся	малатсинтаза G	MSMEG_3640	256	71%	11	130	цитоплазма
Покоящиеся	малатсинтаза G	MSMEG_3640	501	52%	49	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3641	546	74%	104	123	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3641	453	65%	104	123	мембраны
Покоящиеся	глициндегидрогеназа	MSMEG_3642	405	79%	40	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3645	94	65%	63	109	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3645	179	58%	63	109	мембраны
Вегетативные	forkhead-associated protein	MSMEG_3647	166	86%	N/D	22	цитоплазма
Покоящиеся	forkhead-associated protein	MSMEG_3647	128	56%	36	N/D	мембраны
Вегетативные	лектин, связывающий маннозу	MSMEG_3662	198	89%	52	13	мембраны
Покоящиеся	лектин, связывающий маннозу	MSMEG_3662	159	73%	52	13	мембраны

Вегетативные	оксидоредуктаза	MSMEG_3663	120	46%	N/D	87	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3682	80	45%	N/D	72	мембраны
Покоящиеся	Белок-регулятор SpoOJ	MSMEG_3743	56	36%	76	N/D	мембраны
Покоящиеся	Белок семейства MutT / nudix	MSMEG_3745	332	90%	154	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	ЦТФ-синтаза	MSMEG_3746	401	86%	41	N/D	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_3753	161	73%	N/D	108	цитоплазма
Вегетативные	Белок, содержащий TPR-повтор	MSMEG_3754	87	42%	N/D	86	мембраны
Вегетативные	транспорт макролидов, АТФ-связывающий белок, транспортер abc	MSMEG_3768	94	46%	N/D	24	мембраны
Покоящиеся	аргининосукцинатлиаза	MSMEG_3769	63	43%	35	N/D	мембраны
Покоящиеся	аргининосукцинатсинтаза	MSMEG_3770	376	82%	86	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	ацетилорнитинаминотрансфераза	MSMEG_3773	66	31%	84	N/D	мембраны
Покоящиеся	ацетилглутаматкиназа	MSMEG_3774	107	61%	42	N/D	мембраны
Покоящиеся	фенилаланил-тРНК синтаза, бета-субъединица	MSMEG_3777	430	68%	69	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	гидролаза	MSMEG_3810	90	73%	97	N/D	цитоплазма
Вегетативные	30S рибосомный белок S1	MSMEG_3833	220	59%	N/D	31	мембраны
Вегетативные	гликозилтрансфераза	MSMEG_3859	118	55%	N/D	23	мембраны
Покоящиеся	амидогидролаза 3	MSMEG_3861	199	50%	148	N/D	цитоплазма
Вегетативные	пролин дипептидаза	MSMEG_3881	244	92%	N/D	92	цитоплазма
Вегетативные	альфа-субъединица протеасомы	MSMEG_3894	107	69%	N/D	20	мембраны
Покоящиеся	альфа-субъединица протеасомы	MSMEG_3894	157	91%	22	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	бета-субъединица протеасомы	MSMEG_3895	255	73%	68	N/D	цитоплазма
Вегетативные	АТФаза, белок семейства AAA	MSMEG_3902	360	72%	65	70	мембраны
Покоящиеся	АТФаза, белок семейства AAA	MSMEG_3902	171	53%	24	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	АТФаза, белок семейства AAA	MSMEG_3902	346	60%	65	70	мембраны
Вегетативные	Антиген 14 kDa	MSMEG_3932	289	84%	N/D	26	цитоплазма
Вегетативные	Антиген 14 kDa	MSMEG_3932	264	84%	N/D	81	мембраны
Покоящиеся	Антиген 14 kDa	MSMEG_3932	329	82%	2	N/D	мембраны
Вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_3945	357	93%	N/D	9	мембраны
Вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_3950	283	82%	98	33	цитоплазма

Покоящиеся	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_3950	249	90%	98	33	цитоплазма
Покоящиеся	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_3950	513	95%	29	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3952	429	88%	114	140	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3952	342	72%	114	140	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3952	477	74%	27	N/D	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_3955	198	72%	66	N/D	мембраны
Вегетативные	оксидоредуктаза, белок семейства альдо / кеторедуктазы	MSMEG_4093	107	49%	N/D	47	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4187	433	78%	51	55	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4187	538	86%	51	55	мембраны
Вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_4188	119	52%	24	91	мембраны
Покоящиеся	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_4188	463	94%	24	91	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4199	158	99%	N/D	46	цитоплазма
Покоящиеся	пептидаза M20	MSMEG_4200	84	56%	46	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Белок DivIVA	MSMEG_4217	103	59%	131	41	цитоплазма
Вегетативные	Белок DivIVA	MSMEG_4217	139	74%	N/D	80	мембраны
Покоящиеся	Белок DivIVA	MSMEG_4217	131	54%	131	41	цитоплазма
Покоящиеся	Белок DivIVA	MSMEG_4217	380	97%	30	N/D	мембраны
Вегетативные	белок деления клеток FtsZ	MSMEG_4222	130	74%	N/D	133	цитоплазма
Вегетативные	белок деления клеток FtsZ	MSMEG_4222	70	35%	N/D	40	мембраны
Покоящиеся	UDP-N-ацетилмурамоилаланин - D-глутаматлигаза	MSMEG_4229	50	33%	112	N/D	мембраны
Покоящиеся	UDP-N-ацетилмурамоил-трипептид - D-аланил-D-аланинлигаза	MSMEG_4231	81	48%	35	N/D	мембраны
Покоящиеся	3-дезоксигептулатсинтаза	MSMEG_4244	110	63%	6	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	3-дезоксигептулатсинтаза	MSMEG_4244	112	50%	102	N/D	мембраны
Вегетативные	АМФ-связывающий фермент	MSMEG_4254	360	64%	N/D	75	мембраны
Покоящиеся	аденозинкиназа	MSMEG_4270	255	93%	105	N/D	цитоплазма
Вегетативные	никотинат-нуклеотид - диметилбензимидазолфосфорибозилтрансфераза	MSMEG_4275	114	81%	N/D	102	цитоплазма
Вегетативные	аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью	MSMEG_4276	246	78%	N/D	106	цитоплазма
Покоящиеся	система расщепления глицина Т-белок	MSMEG_4278	190	76%	67	N/D	цитоплазма
Вегетативные	аминопептидаза	MSMEG_4281	399	77%	N/D	148	цитоплазма

Веgetативные	аминопептидаза	MSMEG_4281	134	50%	N/D	12	мембраны
Покоящиеся	аминопептидаза	MSMEG_4281	203	71%	33	N/D	мембраны
Веgetативные	2-оксоглутаратдегидрогеназа, компонент E2, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза	MSMEG_4283	170	45%	92	18	цитоплазма
Веgetативные	2-оксоглутаратдегидрогеназа, компонент E2, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза	MSMEG_4283	212	54%	16	64	мембраны
Покоящиеся	2-оксоглутаратдегидрогеназа, компонент E2, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза	MSMEG_4283	203	48%	92	18	цитоплазма
Покоящиеся	2-оксоглутаратдегидрогеназа, компонент E2, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза	MSMEG_4283	317	52%	16	64	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4284	99	69%	24	N/D	мембраны
Веgetативные	глутамин синтетаза, тип I	MSMEG_4290	59	38%	N/D	3	мембраны
Покоящиеся	глутамин синтетаза, тип I	MSMEG_4290	241	84%	1	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	глутамин синтетаза, тип I	MSMEG_4290	117	59%	35	N/D	мембраны
Веgetативные	протеаза	MSMEG_4296	274	70%	127	23	мембраны
Покоящиеся	протеаза	MSMEG_4296	273	64%	127	23	мембраны
Покоящиеся	3-метил-2-оксобутаноат гидроксиметилтрансфераза	MSMEG_4298	113	60%	46	N/D	мембраны
Веgetативные	еноил-КоА гидратаза / изомераза	MSMEG_4299	126	55%	N/D	94	цитоплазма
Покоящиеся	регулятор транскрипции AmtR	MSMEG_4300	100	73%	115	N/D	мембраны
Веgetативные	глиоксалаза / белок устойчивости к блеомицину / диоксигеназа	MSMEG_4313	196	99%	25	35	цитоплазма
Покоящиеся	глиоксалаза / белок устойчивости к блеомицину / диоксигеназа	MSMEG_4313	248	99%	25	35	цитоплазма
Веgetативные	трансацилаза белка-носителя малонил-КоА-ацила	MSMEG_4325	225	92%	74	3	цитоплазма
Покоящиеся	трансацилаза белка-носителя малонил-КоА-ацила	MSMEG_4325	105	45%	74	3	цитоплазма
Веgetативные	3-оксоацил- [ацил-белок-носитель] синтаза 1	MSMEG_4327	403	93%	3	16	мембраны
Покоящиеся	3-оксоацил- [ацил-белок-носитель] синтаза 1	MSMEG_4327	448	89%	3	16	мембраны
Веgetативные	3-оксоацил- [ацил-белок-носитель] синтаза 2	MSMEG_4328	328	80%	N/D	65	цитоплазма
Покоящиеся	3-оксоацил- [ацил-белок-носитель] синтаза 2	MSMEG_4328	446	91%	7	N/D	мембраны
Покоящиеся	НАД / микотиол-зависимая формальдегиддегидрогеназа	MSMEG_4340	251	85%	34	N/D	цитоплазма
Веgetативные	белок семейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_4342	81	74%	N/D	93	цитоплазма
Покоящиеся	белок семейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_4342	85	79%	34	N/D	мембраны

Веgetативные	conserved hypothetical proline rich protein	MSMEG_4349	118	28%	N/D	122	мембраны
Веgetативные	D-бета-гидроксибутиратдегидрогеназа	MSMEG_4358	155	91%	N/D	151	цитоплазма
Веgetативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_4362	75	49%	N/D	45	мембраны
Веgetативные	формамидаза	MSMEG_4367	362	75%	141	141	цитоплазма
Покоящиеся	формамидаза	MSMEG_4367	370	91%	141	141	цитоплазма
Веgetативные	амидаза	MSMEG_4381	163	94%	N/D	108	цитоплазма
Покоящиеся	ABC-переносчик олигопептид-связывающего белка	MSMEG_4385	355	80%	130	N/D	мембраны
Веgetативные	фосфоноацетальдегид гидролаза	MSMEG_4401	92	85%	N/D	52	цитоплазма
Покоящиеся	модулятор ДНК-гиразы	MSMEG_4464	343	82%	76	N/D	цитоплазма
Веgetативные	предполагаемый консервативный трансмембранный белок	MSMEG_4484	138	47%	N/D	38	мембраны
Покоящиеся	глицил-тРНК синтетаза	MSMEG_4485	384	91%	112	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	ГТФ-связывающий белок Era	MSMEG_4493	109	45%	66	N/D	мембраны
Веgetативные	Белок семейства PhoH	MSMEG_4497	277	80%	N/D	32	мембраны
Веgetативные	термоиндуцибельный репрессор транскрипции HrcA	MSMEG_4505	67	32%	N/D	86	мембраны
Веgetативные	сульфатный переносчик ABC, АТФ-связывающий белок	MSMEG_4530	102	54%	N/D	59	мембраны
Веgetативные	сульфат-связывающий белок	MSMEG_4533	152	71%	105	21	цитоплазма
Веgetативные	сульфат-связывающий белок	MSMEG_4533	363	77%	4	3	мембраны
Покоящиеся	сульфат-связывающий белок	MSMEG_4533	126	63%	105	21	цитоплазма
Покоящиеся	сульфат-связывающий белок	MSMEG_4533	254	75%	4	3	мембраны
Веgetативные	основной мембранный белок I	MSMEG_4537	221	61%	N/D	115	мембраны
Веgetативные	цистеин десульфурaza, SufS	MSMEG_4538	79	36%	N/D	67	мембраны
Веgetативные	ABC Fe3 + транспортер сидерофоров, периплазматический связывающий белок	MSMEG_4561	150	71%	N/D	84	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4578	127	57%	N/D	39	мембраны
Веgetативные	ГТФ-связывающий белок Obg / CgtA	MSMEG_4623	273	51%	45	49	мембраны
Покоящиеся	ГТФ-связывающий белок Obg / CgtA	MSMEG_4623	588	81%	45	49	мембраны
Веgetативные	нуклеозид дифосфаткиназа	MSMEG_4627	142	79%	106	72	цитоплазма
Покоящиеся	нуклеозид дифосфаткиназа	MSMEG_4627	218	90%	106	72	цитоплазма
Покоящиеся	валил-тРНК синтетаза	MSMEG_4630	279	64%	40	N/D	цитоплазма

Покоящиеся	сахаропиндегидрогеназа	MSMEG_4632	122	55%	2	N/D	мембраны
Покоящиеся	пептидаза S9, пролилолигопептидаза	MSMEG_4633	274	81%	108	N/D	мембраны
Веgetативные	альфа-оксоглутарат, ферредоксин оксидоредуктаза, бета-субъединица	MSMEG_4645	281	93%	N/D	19	цитоплазма
Покоящиеся	альфа-оксоглутарат, ферредоксин оксидоредуктаза, бета-субъединица	MSMEG_4645	325	90%	42	N/D	мембраны
Покоящиеся	пируватсинтаза	MSMEG_4646	454	89%	77	N/D	мембраны
Веgetативные	углеводкиназа, PfkB	MSMEG_4647	72	47%	N/D	29	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая оксидоредуктаза YisS	MSMEG_4650	265	77%	82	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	D-олиоза 4-кеторедуктаза	MSMEG_4652	80	44%	42	N/D	мембраны
Покоящиеся	Протеаза Clp	MSMEG_4672	193	58%	49	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	Протеаза Clp	MSMEG_4673	125	55%	84	N/D	цитоплазма
Веgetативные	триггер фактор	MSMEG_4674	370	88%	126	40	цитоплазма
Веgetативные	триггер фактор	MSMEG_4674	185	62%	54	125	мембраны
Покоящиеся	триггер фактор	MSMEG_4674	291	76%	126	40	цитоплазма
Покоящиеся	триггер фактор	MSMEG_4674	207	58%	54	125	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4681	109	40%	86	N/D	мембраны
Покоящиеся	рибозо-5-фосфат-изомеразы	MSMEG_4684	212	74%	110	N/D	цитоплазма
Веgetативные	предполагаемая оксидоредуктаза YdbC	MSMEG_4686	87	53%	48	29	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая оксидоредуктаза YdbC	MSMEG_4686	113	68%	48	29	мембраны
Покоящиеся	аминопептидаза N	MSMEG_4690	283	61%	48	N/D	цитоплазма
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4692	240	91%	6	4	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_4692	133	87%	6	4	мембраны
Покоящиеся	белок семейства альфа-амилаз	MSMEG_4696	364	63%	142	N/D	цитоплазма
Веgetативные	ABC-транспортный белок, АТФ-связывающий компонент	MSMEG_4700	296	56%	N/D	53	мембраны
Веgetативные	еноил-КоА гидратаза	MSMEG_4709	313	95%	N/D	134	цитоплазма
Веgetативные	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_4722	152	50%	115	63	мембраны
Покоящиеся	короткоцепочечная дегидрогеназа	MSMEG_4722	427	95%	115	63	мембраны
Веgetативные	Белки семейства ErfK / YbiS / YcfS / YnhG	MSMEG_4745	74	26%	N/D	79	мембраны
Покоящиеся	антиоксидант, белок семейства AhpC / TSA	MSMEG_4753	153	59%	79	N/D	мембраны
Веgetативные	пептидаза M20	MSMEG_4755	310	87%	76	86	цитоплазма

Покоящиеся	пептидаза M20	MSMEG_4755	123	66%	76	86	цитоплазма
Покоящиеся	алкилгидропероксидаза, белок семейства AhpD	MSMEG_4890	66	61%	81	N/D	цитоплазма
Вегетативные	алкилгидропероксидредуктаза	MSMEG_4891	224	67%	32	13	цитоплазма
Вегетативные	алкилгидропероксидредуктаза	MSMEG_4891	134	67%	94	109	мембраны
Покоящиеся	алкилгидропероксидредуктаза	MSMEG_4891	306	85%	32	13	цитоплазма
Покоящиеся	алкилгидропероксидредуктаза	MSMEG_4891	372	91%	94	109	мембраны
Вегетативные	Предполагаемая нейтральная цинк-металлопептидаза	MSMEG_4893	79	27%	N/D	74	мембраны
Покоящиеся	металл-зависимая гидролаза суперсемейства бета-лактамаз белка III	MSMEG_4902	107	65%	37	N/D	мембраны
Покоящиеся	белок семейства альфа-глюканфосфорилазы	MSMEG_4915	662	83%	66	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Белок с тетрапептидным повторяющимся доменом	MSMEG_4917	231	90%	N/D	69	цитоплазма
Покоящиеся	1,4-альфа-глюкановый фермент разветвления	MSMEG_4918	369	94%	108	N/D	цитоплазма
Вегетативные	ацетил-КоА ацетилтрансфераза	MSMEG_4920	271	84%	21	9	цитоплазма
Покоящиеся	ацетил-КоА ацетилтрансфераза	MSMEG_4920	227	86%	21	9	цитоплазма
Вегетативные	метилмалонил-КоА эпимераза	MSMEG_4921	124	73%	N/D	64	цитоплазма
Вегетативные	UDP-N-ацетилглюкозамин 1-карбоксивинилтрансфераза	MSMEG_4932	45	27%	N/D	26	мембраны
Вегетативные	АТФ-синтаза F1, бета-субъединица	MSMEG_4936	314	70%	120	10	мембраны
Покоящиеся	ATP synthase F1, beta subunit	MSMEG_4936	305	85%	120	10	мембраны
Вегетативные	АТФ-синтаза F1, бета-субъединица	MSMEG_4937	71	30%	N/D	69	мембраны
Вегетативные	АТФ-синтаза F1, альфа-субъединица	MSMEG_4938	206	65%	44	60	цитоплазма
Вегетативные	АТФ-синтаза F1, альфа-субъединица	MSMEG_4938	233	50%	38	62	мембраны
Покоящиеся	АТФ-синтаза F1, альфа-субъединица	MSMEG_4938	109	59%	44	60	цитоплазма
Покоящиеся	АТФ-синтаза F1, альфа-субъединица	MSMEG_4938	410	71%	38	62	мембраны
Вегетативные	треонинсинтаза	MSMEG_4956	387	96%	N/D	75	цитоплазма
Покоящиеся	треонинсинтаза	MSMEG_4956	70	54%	134	N/D	мембраны
Вегетативные	гомосериндегидрогеназа	MSMEG_4957	123	61%	N/D	25	мембраны
Покоящиеся	гомосериндегидрогеназа	MSMEG_4957	149	60%	105	N/D	мембраны
Покоящиеся	оксидоредуктаза	MSMEG_4971	101	70%	128	N/D	цитоплазма
Вегетативные	изохоризматаза гидролаза	MSMEG_4976	78	71%	N/D	117	цитоплазма
Покоящиеся	изохоризматаза гидролаза	MSMEG_4976	198	96%	40	N/D	мембраны

Вегетативные	карбоангидраза	MSMEG_4985	216	87%	81	42	цитоплазма
Покоящиеся	карбоангидраза	MSMEG_4985	194	89%	81	42	цитоплазма
Вегетативные	bacterial extracellular solute-binding protein, family protein 5	MSMEG_4999	133	54%	37	18	мембраны
Покоящиеся	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества, семейство 5	MSMEG_4999	139	34%	37	18	мембраны
Покоящиеся	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества, семейство 5	MSMEG_4999	182	62%	37	18	мембраны
Вегетативные	оксидоредуктаза, связывание FAD	MSMEG_5037	174	79%	N/D	91	цитоплазма
Вегетативные	Белок LprE	MSMEG_5043	75	51%	N/D	111	мембраны
Покоящиеся	ABC-транспортёр, белок семейства транспортеров четвертичного амина (QAT), субстрат-связывающий белок	MSMEG_5054	163	86%	67	N/D	мембраны
Вегетативные	НАД-зависимый малеиновый фермент	MSMEG_5055	279	94%	N/D	102	цитоплазма
Вегетативные	ABC транспортёр, АТФ-связывающий белок SugC	MSMEG_5058	88	53%	N/D	16	мембраны
Вегетативные	Белок Mrp	MSMEG_5068	74	44%	134	32	мембраны
Покоящиеся	Белок Mrp	MSMEG_5068	164	75%	134	32	мембраны
Вегетативные	Трипсин	MSMEG_5070	277	60%	37	29	мембраны
Покоящиеся	Трипсин	MSMEG_5070	130	61%	37	29	мембраны
Вегетативные	О-метилтрансфераза, семейство белков 3	MSMEG_5073	188	79%	N/D	112	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5089	352	77%	N/D	121	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5090	255	90%	N/D	117	мембраны
Вегетативные	тетрагидропиридинатсукцинилза	MSMEG_5104	309	76%	132	95	цитоплазма
Покоящиеся	тетрагидропиридинатсукцинилза	MSMEG_5104	202	88%	132	95	цитоплазма
Покоящиеся	1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа	MSMEG_5119	344	61%	130	N/D	цитоплазма
Вегетативные	ферредоксин	MSMEG_5122	101	46%	N/D	78	цитоплазма
Покоящиеся	N-ацетил-1-D-мио-инозитил-2-амино-2-дезоксиглюкопиранозид деацетилаза MshB	MSMEG_5129	72	81%	43	N/D	цитоплазма
Вегетативные	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества, семейство 5	MSMEG_5130	465	63%	89	27	мембраны
Покоящиеся	бактериальный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества, семейство 5	MSMEG_5130	394	62%	89	27	мембраны
Вегетативные	ГТФ-связывающий белок TsrA / VirA	MSMEG_5132	390	85%	N/D	38	мембраны
Покоящиеся	ГТФ-связывающий белок TsrA / VirA	MSMEG_5132	411	71%	124	N/D	мембраны
Покоящиеся	Неизвестный белок	MSMEG_5136	73	45%	95	N/D	цитоплазма

Покоящиеся	Неизвестный белок	MSMEG_5136	377	72%	39	N/D	мембраны
Вегетативные	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_5183	230	89%	75	77	цитоплазма
Покоящиеся	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_5183	144	63%	75	77	цитоплазма
Покоящиеся	3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_5183	159	77%	92	N/D	мембраны
Покоящиеся	альфа-метилацил-КоА рацемаза	MSMEG_5184	71	45%	127	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок с фасциклиновым доменом	MSMEG_5196	91	52%	N/D	139	цитоплазма
Вегетативные	карнитинил-КоА дегидратаза	MSMEG_5198	110	54%	N/D	105	цитоплазма
Вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_5199	90	54%	N/D	1	цитоплазма
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_5209	76	62%	N/D	55	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5225	92	47%	37	N/D	мембраны
Вегетативные	белок семейства диенелактонгидролаз	MSMEG_5236	122	43%	N/D	72	мембраны
Покоящиеся	фруктозо-1,6-бисфосфатаза, класс II	MSMEG_5239	131	57%	73	N/D	цитоплазма
Вегетативные	фумаратгидратаза класса II	MSMEG_5240	370	69%	36	98	цитоплазма
Покоящиеся	фумаратгидратаза класса II	MSMEG_5240	491	78%	36	98	цитоплазма
Покоящиеся	Неизвестный белок	MSMEG_5243	160	90%	101	N/D	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_5245	366	93%	N/D	29	цитоплазма
Вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_5245	66	59%	39	42	мембраны
Покоящиеся	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_5245	71	30%	39	42	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5246	209	80%	22	95	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5246	299	88%	7	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5246	237	90%	22	95	мембраны
Вегетативные	серин гидроксиметилтрансфераза	MSMEG_5249	364	91%	6	145	цитоплазма
Покоящиеся	серин гидроксиметилтрансфераза	MSMEG_5249	75	48%	6	145	цитоплазма
Покоящиеся	серин гидроксиметилтрансфераза	MSMEG_5249	205	85%	100	N/D	мембраны
Вегетативные	микотиол конъюгат амидаза Msa	MSMEG_5261	51	36%	N/D	55	мембраны
Покоящиеся	микотиол конъюгат амидаза Msa	MSMEG_5261	85	67%	19	N/D	мембраны
Вегетативные	фактор элонгации транскрипции GreA	MSMEG_5263	109	68%	N/D	27	цитоплазма
Вегетативные	цистатионин бета-синтаза	MSMEG_5270	275	84%	N/D	71	цитоплазма
Вегетативные	бета-кетoadипил-КоА тиолаза	MSMEG_5273	320	89%	26	5	цитоплазма

Покоящиеся	бета-кетoadипил-КоА тиолаза	MSMEG_5273	333	84%	26	5	цитоплазма
Покоящиеся	бета-кетoadипил-КоА тиолаза	MSMEG_5273	99	75%	60	N/D	мембраны
Вегетативные	еноил-КоА гидратаза	MSMEG_5276	96	59%	131	41	цитоплазма
Покоящиеся	еноил-КоА гидратаза	MSMEG_5276	127	56%	131	41	цитоплазма
Покоящиеся	дегидрогеназа	MSMEG_5287	86	40%	97	N/D	мембраны
Вегетативные	эктоин / гидроксизэктоин ABC транспортер	MSMEG_5368	247	83%	23	16	мембраны
Покоящиеся	эктоин / гидроксизэктоин ABC транспортер	MSMEG_5368	189	67%	23	16	мембраны
Вегетативные	иммуногенный белок MPT63	MSMEG_5412	86	51%	N/D	138	цитоплазма
Вегетативные	энолаза	MSMEG_5415	311	76%	58	25	цитоплазма
Вегетативные	энолаза	MSMEG_5415	325	63%	N/D	74	мембраны
Покоящиеся	энолаза	MSMEG_5415	409	90%	58	25	цитоплазма
Покоящиеся	энолаза	MSMEG_5415	311	66%	78	N/D	мембраны
Вегетативные	рибосомный белок L25, Ctc-форма	MSMEG_5431	136	35%	N/D	48	мембраны
Покоящиеся	рибосомный белок L25, Ctc-форма	MSMEG_5431	69	39%	59	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5452	165	64%	N/D	111	мембраны
Покоящиеся	холоилглицин гидролаза	MSMEG_5454	112	63%	125	N/D	цитоплазма
Вегетативные	УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилитрансфераза	MSMEG_5471	182	64%	N/D	83	мембраны
Покоящиеся	УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилитрансфераза	MSMEG_5471	145	64%	96	N/D	мембраны
Вегетативные	порин	MSMEG_5483	48	21%	18	63	мембраны
Покоящиеся	порин	MSMEG_5483	78	24%	18	63	мембраны
Вегетативные	белок биосинтеза молибдоптерина	MSMEG_5485	159	100%	N/D	114	цитоплазма
Покоящиеся	ДНК-связывающий регулятор	MSMEG_5488	104	62%	101	N/D	мембраны
Покоящиеся	магний хелатаза	MSMEG_5512	608	86%	56	N/D	мембраны
Вегетативные	сукцинил-КоА синтетаза, альфа-субъединица	MSMEG_5524	329	90%	41	10	цитоплазма
Покоящиеся	сукцинил-КоА синтетаза, альфа-субъединица	MSMEG_5524	228	90%	41	10	цитоплазма
Покоящиеся	сукцинил-КоА синтетаза, альфа-субъединица	MSMEG_5524	236	67%	46	N/D	мембраны
Вегетативные	сукцинил-КоА синтетаза, бета-субъединица	MSMEG_5525	189	52%	28	118	цитоплазма
Покоящиеся	сукцинил-КоА синтетаза, бета-субъединица	MSMEG_5525	421	74%	28	118	цитоплазма
Вегетативные	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_5538	241	58%	71	131	цитоплазма

Покоящиеся	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_5538	227	57%	71	131	цитоплазма
Покоящиеся	глюкозо-6-фосфат изомеразы	MSMEG_5541	147	77%	8	N/D	цитоплазма
Веgetативные	клавальдегиддегидрогеназа	MSMEG_5568	77	50%	N/D	65	мембраны
Веgetативные	Белок Ku	MSMEG_5580	61	31%	N/D	50	мембраны
Веgetативные	белок семейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_5638	359	82%	N/D	77	мембраны
Покоящиеся	связывающий белок	MSMEG_5664	96	44%	95	N/D	мембраны
Покоящиеся	фитоендегидрогеназа	MSMEG_5667	129	38%	148	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	цитрат-синтаза	MSMEG_5676	103	59%	33	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	елок семейства глиоксалаз	MSMEG_5680	80	70%	6	N/D	мембраны
Покоящиеся	фосфосерин аминотрансфераза	MSMEG_5684	133	47%	113	N/D	цитоплазма
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5690	158	82%	N/D	40	мембраны
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5691	113	62%	N/D	150	цитоплазма
Покоящиеся	глутатион S-трансфераза	MSMEG_5695	145	63%	132	N/D	цитоплазма
Веgetативные	ацетил-KoA ацетилтрансфераза	MSMEG_5721	54	30%	50	77	мембраны
Покоящиеся	ацетил-KoA ацетилтрансфераза	MSMEG_5721	103	27%	50	77	мембраны
Веgetативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_5733	97	73%	15	36	мембраны
Покоящиеся	белок семейства универсальных стрессовых белков	MSMEG_5733	324	86%	15	36	мембраны
Покоящиеся	индол-3-пируват декарбоксилаза	MSMEG_5735	208	86%	61	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	индол-3-пируват декарбоксилаза	MSMEG_5735	74	49%	105	N/D	мембраны
Покоящиеся	десатураза жирных кислот	MSMEG_5773	96	53%	125	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	десатураза жирных кислот	MSMEG_5773	140	53%	67	N/D	мембраны
Веgetативные	транспортер фосфата ABC, фосфат-связывающий белок PstS	MSMEG_5782	100	64%	75	48	мембраны
Покоящиеся	транспортер фосфата ABC, фосфат-связывающий белок PstS	MSMEG_5782	78	75%	75	48	мембраны
Покоящиеся	предполагаемая тиосульфат-серотрансфераза	MSMEG_5789	447	97%	22	N/D	цитоплазма
Веgetативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5792	72	50%	N/D	117	цитоплазма
Покоящиеся	аминометилтрансфераза	MSMEG_5796	115	63%	42	N/D	мембраны
Покоящиеся	фосфорибозилформилглицинамидинсинтаза II	MSMEG_5824	348	72%	63	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	аспартиламинопептидаза	MSMEG_5828	100	57%	57	N/D	мембраны
Покоящиеся	фосфорибозилформилглицинамидинсинтаза I	MSMEG_5831	166	69%	147	N/D	цитоплазма

Вегетативные	белок семейства глутатионпероксидаз	MSMEG_5837	104	63%	N/D	45	цитоплазма
Покоящиеся	фосфорибозиламиноимидазол-сукцинокарбоксамидсинтаза	MSMEG_5841	261	83%	74	N/D	цитоплазма
Вегетативные	фосфорибозиламин - глицинлигаза	MSMEG_5852	237	82%	N/D	82	цитоплазма
Вегетативные	ДНК-связывающий регулятор PhoP	MSMEG_5872	206	79%	N/D	51	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5873	129	62%	N/D	93	цитоплазма
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_5873	81	58%	34	N/D	мембраны
Вегетативные	3-кетостероиддегидрогеназа	MSMEG_5941	169	36%	N/D	38	мембраны
Покоящиеся	ацетил-КоА ацетилтрансфераза	MSMEG_6008	136	54%	67	N/D	цитоплазма
Вегетативные	секретируемый белок	MSMEG_6049	297	67%	N/D	107	мембраны
Вегетативные	липопротеин	MSMEG_6064	101	42%	N/D	13	мембраны
Вегетативные	белок суперсемейства металло-бета-лактамаз	MSMEG_6071	221	65%	N/D	66	мембраны
Покоящиеся	цистеинил-тРНК синтетаза	MSMEG_6074	126	53%	109	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	2-С-метил-D-эритритол-4-фосфатцитидилтрансфераза	MSMEG_6076	107	79%	92	N/D	мембраны
Вегетативные	Белок LpqE	MSMEG_6078	115	26%	N/D	64	мембраны
Покоящиеся	белок с монооксигеназным доменом	MSMEG_6086	179	94%	27	N/D	цитоплазма
Вегетативные	негативный регулятор генетической компетентности ClpC / mecB	MSMEG_6091	256	60%	54	1	мембраны
Покоящиеся	негативный регулятор генетической компетентности ClpC / mecB	MSMEG_6091	388	69%	54	1	мембраны
Покоящиеся	лизил-тРНК синтетаза	MSMEG_6094	203	64%	51	N/D	цитоплазма
Вегетативные	пантоат - бета-аланинлигаза	MSMEG_6097	203	96%	N/D	43	мембраны
Вегетативные	ГТФ циклогидролаза I	MSMEG_6104	96	52%	N/D	17	мембраны
Вегетативные	неорганическая пирофосфатаза	MSMEG_6114	140	87%	42	124	цитоплазма
Покоящиеся	неорганическая пирофосфатаза	MSMEG_6114	171	55%	42	124	цитоплазма
Покоящиеся	D-изомерспецифическая дегидрогеназа 2-гидроксикислот	MSMEG_6126	121	63%	136	N/D	цитоплазма
Вегетативные	уклеозид-дифосфат-сахар эпимераза	MSMEG_6142	66	50%	N/D	67	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6163	64	62%	N/D	41	мембраны
Покоящиеся	ацетил-кофермент А синтетаза	MSMEG_6179	486	74%	102	N/D	цитоплазма
Вегетативные	ингибитор инициации трансляции	MSMEG_6191	158	94%	89	23	цитоплазма
Покоящиеся	ингибитор инициации трансляции	MSMEG_6191	148	80%	89	23	цитоплазма

Вегетативные	анион-транспортная АТФаза	MSMEG_6193	176	70%	N/D	22	мембраны
Покоящиеся	диаминопимелатдекарбоксилаза	MSMEG_6197	88	51%	39	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	регулятор транскрипции, белок семейства PadR	MSMEG_6227	315	93%	4	N/D	мембраны
Вегетативные	белок суперсемейства тиопурин S-метилтрансфераз (tpmt)	MSMEG_6235	144	90%	N/D	52	цитоплазма
Вегетативные	АТФаза, AAA-5	MSMEG_6241	149	56%	N/D	75	мембраны
Вегетативные	алкогольдегидрогеназа, железосодержащая	MSMEG_6242	267	55%	N/D	52	мембраны
Покоящиеся	алкогольдегидрогеназа, железосодержащая	MSMEG_6242	84	45%	39	N/D	цитоплазма
Вегетативные	аспартат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_6256	381	86%	N/D	1	цитоплазма
Покоящиеся	аспартат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_6256	98	53%	53	N/D	мембраны
Покоящиеся	белок семейства нитроредуктаз	MSMEG_6258	78	44%	137	N/D	мембраны
Покоящиеся	2-изопропилмалатсинтаза	MSMEG_6271	88	48%	37	N/D	цитоплазма
Вегетативные	синтаза кобириновой кислоты	MSMEG_6277	69	54%	N/D	35	мембраны
Вегетативные	Белок KanY	MSMEG_6282	303	99%	17	4	мембраны
Покоящиеся	Белок KanY	MSMEG_6282	169	75%	17	4	мембраны
Вегетативные	циклопропан-ацил-фосфолипидсинтаза	MSMEG_6284	249	51%	N/D	87	мембраны
Покоящиеся	Гамма / тау субъединица ДНК-полимеразы III	MSMEG_6285	126	22%	58	N/D	мембраны
Вегетативные	аспартат трансаминаза	MSMEG_6286	373	77%	47	89	цитоплазма
Покоящиеся	аспартат трансаминаза	MSMEG_6286	129	60%	47	89	цитоплазма
Вегетативные	ABC транспортер, АТФ-связывающий белок	MSMEG_6309	273	82%	N/D	45	мембраны
Вегетативные	липолитический фермент, G-D-S-L	MSMEG_6317	94	73%	143	112	цитоплазма
Покоящиеся	липолитический фермент, G-D-S-L	MSMEG_6317	197	82%	143	112	цитоплазма
Вегетативные	пенициллин-связывающий белок, транспептидаза	MSMEG_6319	272	59%	N/D	74	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6329	97	71%	129	N/D	мембраны
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6381	281	75%	N/D	96	цитоплазма
Покоящиеся	бета-цепь пропионил-КоА карбоксилазы	MSMEG_6391	259	68%	79	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	бета-цепь пропионил-КоА карбоксилазы	MSMEG_6391	395	76%	45	N/D	мембраны
Покоящиеся	бета-цепь пропионил-КоА карбоксилазы	MSMEG_6393	317	79%	111	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	UDP-галактопираноза мутаза	MSMEG_6404	405	82%	78	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6412	106	66%	N/D	74	цитоплазма

Вегетативные	белок с роданеподобным доменом	MSMEG_6425	83	45%	N/D	127	цитоплазма
Покоящиеся	[Mn] супероксиддисмутаза	MSMEG_6427	179	89%	5	N/D	цитоплазма
Вегетативные	регулятор рибонуклеазной активности A	MSMEG_6439	145	84%	N/D	51	цитоплазма
Вегетативные	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_6452	252	86%	46	87	цитоплазма
Покоящиеся	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_6452	211	77%	46	87	цитоплазма
Покоящиеся	[НАДФ +] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	MSMEG_6452	126	54%	112	N/D	мембраны
Покоящиеся	метионин-S-сульфоксидредуктаза	MSMEG_6477	165	91%	134	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6502	175	59%	3	7	мембраны
Покоящиеся	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6502	114	59%	3	7	мембраны
Покоящиеся	фермент разветвления гликогена GlgX	MSMEG_6507	448	77%	140	N/D	цитоплазма
Вегетативные	Система экспорта лекарств типа ABC, АТФ-связывающий белок	MSMEG_6509	80	43%	N/D	42	мембраны
Покоящиеся	белок домена ацил-КоА дегидрогеназы	MSMEG_6511	152	60%	73	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	мальтокиназа, слитая с трегалозосинтазой	MSMEG_6514	376	72%	144	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	трегалозосинтаза	MSMEG_6515	98	50%	37	N/D	цитоплазма
Вегетативные	консервативный гипотетический белок	MSMEG_6518	164	65%	N/D	110	цитоплазма
Покоящиеся	оротат фосфорибозилтрансфераза	MSMEG_6520	112	46%	134	N/D	цитоплазма
Вегетативные	ABC Полиамин / опин / фосфонатный переносчик, периплазматический лиганд-связывающий белок	MSMEG_6524	261	86%	132	35	мембраны
Покоящиеся	ABC Полиамин / опин / фосфонатный переносчик, периплазматический лиганд-связывающий белок	MSMEG_6524	212	86%	132	35	мембраны
Вегетативные	железозависимая пероксидаза	MSMEG_6567	65	22%	N/D	34	мембраны
Вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_6585	258	73%	N/D	136	цитоплазма
Покоящиеся	5-метилтетрагидроптероилтриглутамат - гомоцистеин S-метилтрансфераза	MSMEG_6638	159	41%	107	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	глутарил-КоА дегидрогеназа	MSMEG_6686	66	37%	127	N/D	цитоплазма
Вегетативные	ABC транспортер, АТФ-связывающий белок	MSMEG_6725	155	58%	N/D	52	мембраны
Вегетативные	оксидоредуктаза, белок семейства альдо / кеторедуктаз	MSMEG_6746	117	54%	N/D	112	мембраны
Покоящиеся	оксидоредуктаза, белок семейства альдо / кеторедуктаз	MSMEG_6746	316	93%	20	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	оксидоредуктаза, белок семейства альдо / кеторедуктаз	MSMEG_6746	92	53%	42	N/D	мембраны
Вегетативные	гипотетический белок	MSMEG_6750	69	65%	N/D	93	цитоплазма

Покоящиеся	Белок с МаоС-подобным доменом	MSMEG_6754	88	47%	20	N/D	цитоплазма
Вегетативные	глицеринкиназа	MSMEG_6759	412	91%	46	8	цитоплазма
Вегетативные	глицеринкиназа	MSMEG_6759	461	82%	N/D	25	мембраны
Покоящиеся	глицеринкиназа	MSMEG_6759	261	78%	46	8	цитоплазма
Вегетативные	глицерин-3-фосфатдегидрогеназа 2	MSMEG_6761	260	62%	N/D	11	мембраны
Вегетативные	интегральный мембранный белок	MSMEG_6783	133	76%	N/D	21	цитоплазма
Вегетативные	транспортер ABC, субстрат-связывающий белок	MSMEG_6804	178	90%	68	22	мембраны
Покоящиеся	транспортер ABC, субстрат-связывающий белок	MSMEG_6804	237	89%	68	22	мембраны
Вегетативные	бета-лактамаза	MSMEG_6822	209	69%	N/D	147	цитоплазма
Вегетативные	рибосомальный белок L9	MSMEG_6894	429	92%	41	1	мембраны
Покоящиеся	рибосомальный белок L9	MSMEG_6894	380	87%	41	1	мембраны
Вегетативные	ДНК-связывающий белок	MSMEG_6896	269	81%	117	103	цитоплазма
Покоящиеся	ДНК-связывающий белок	MSMEG_6896	269	85%	117	103	цитоплазма
Вегетативные	мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	MSMEG_6904	378	88%	100	83	цитоплазма
Вегетативные	мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	MSMEG_6904	156	52%	135	83	мембраны
Покоящиеся	мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	MSMEG_6904	379	82%	100	83	цитоплазма
Покоящиеся	мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	MSMEG_6904	292	64%	135	83	мембраны
Вегетативные	гидролаза	MSMEG_6906	49	54%	N/D	75	мембраны
Покоящиеся	Белок Mmcl	MSMEG_6907	335	76%	94	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	лейцил-тРНК синтетаза	MSMEG_6917	599	75%	56	N/D	цитоплазма
Вегетативные	интегральный мембранный белок MviN	MSMEG_6929	175	28%	126	47	мембраны
Покоящиеся	интегральный мембранный белок MviN	MSMEG_6929	74	12%	126	47	мембраны
Вегетативные	тиоредоксин	MSMEG_6934	113	80%	N/D	20	цитоплазма
Вегетативные	ParB-подобный белок	MSMEG_6938	150	55%	N/D	112	мембраны
Вегетативные	Белок, содержащий домен R3H	MSMEG_6941	289	90%	N/D	73	мембраны
Покоящиеся	Белок, содержащий домен R3H	MSMEG_6941	293	90%	122	N/D	цитоплазма
Покоящиеся	Белок, содержащий домен R3H	MSMEG_6941	86	66%	34	N/D	мембраны

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Белки, выявленные методом двумерного электрофореза в экстрактах вегетативных и покоящихся форм *M. tuberculosis*.

Белки выявляли в мембранных и цитозольных фракциях клеток активных и покоящихся форм *M.tuberculosis*. Вегетативные микобактерии были выращены на среде Сатона в течение 10 дней; покоящиеся формы получали вследствие постепенного закисления среды роста с последующим хранением в микроаэрофильных условиях в течение 4.5 месяцев (обозначенные как «П1») и 13 месяцев (обозначенные как «П2») при комнатной температуре в темноте.

В столбцах, обозначенных как «место в протеоме....», отражено место, которое белок занимает среди всех обнаруженных белков во фракции соответствующего типа клеток. Все белки были ранжированы в соответствии с плотностью пятна от самого высокопредставленного (1) до наименее представленного. Белки, которые отсутствовали в конкретном протеоме, обозначены как «N/D». Если одно пятно содержало несколько разных белков, общая плотность пятен распределялась пропорционально между белками. Белки в таблице отсортированы по номеру гена. Данные полученные с прибора, спектры и результаты поиска, можно обнаружить по ссылке: <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS01450>.

Тип клеток	Название белка	Название гена	Плотность пикта	Score	Coverage	Место в протеоме покоящихся клеток (П1)	Место в протеоме покоящихся клеток (П2)	Место в протеоме вегетативных клеток	Фракция клеток
вегетативные	Белок инициатор хромосомной репликации DnaA	Rv0001	2,1	623	87%	N/D	N/D	83	мембраны
покоящиеся (П1)	ДНК-полимераза III (бета-цепь) DnaN (ДНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv0002	23,1	66	49%	17	39	67	цитоплазма
покоящиеся (П2)	ДНК-полимераза III (бета-цепь) DnaN (ДНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv0002	31,8	86	43%	17	39	67	цитоплазма
вегетативные	ДНК-гираза (субъединица В) GyrB (ДНК-топоизомераза (АТФ-гидролиз)) (ДНК-топоизомераза II) (ДНК-топоизомераза типа II)	Rv0005	8,8	323	41%	N/D	N/D	64	мембраны
вегетативные	регулируемая железом пептидил-пролил цис-транс-изомераза A PpiA (PPIase A) (ротамаза А)	Rv0009	37,3	86	82%	N/D	N/D	38	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок с доменом FHA, FhaA	Rv0020c	21,4	456	95%	37	44	65	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок с доменом FHA, FhaA	Rv0020c	2,6	91	78%	N/D	N/D	87	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок с доменом FHA, FhaA	Rv0020c	23,9	161	54%	37	44	65	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0036c	1,1	393	97%	N/D	N/D	158	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv0036c	93,6	165	76%	N/D	12	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	гидролаза	Rv0045c	27,6	72	50%	58	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	мио-инозитол-1-фосфатсинтаза Ino1 (инозитол-1-фосфатсинтаза) (D- глюкозо-6-фосфатциклоальдолаза) (глюкозо-6-фосфатциклаза) (глюкоциклоальдолаза)	Rv0046c	6,8	139	67%	N/D	N/D	119	цитоплазма
вегетативные	изоцитратдегидрогеназа [NADP] Icd2 (оксалосукцинатдекарбоксилаза) (IDH)	Rv0066c	3	145	58%	N/D	N/D	136	цитоплазма
покоящиеся (П1)	аминотрансфераза	Rv0075	6,5	80	42%	41	N/D	73	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Гипотетический белок	Rv0078A	111,9	116	29%	25	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	оксидоредуктаза	Rv0097	15,6	65	43%	N/D	N/D	89	цитоплазма
вегетативные	CoA-лигаза жирных кислот FadD7 (CoA-синтаза жирных кислот) (CoA- синтаза жирных кислот)	Rv0119	6,1	270	74%	N/D	N/D	126	цитоплазма
вегетативные	фактор элонгации G FusA2 (EF-G)	Rv0120c	6,3	545	90%	N/D	N/D	124	цитоплазма
вегетативные	Мальтокиназа Мак	Rv0127	2,3	199	68%	N/D	N/D	97	мембраны
покоящиеся (П2)	Мальтокиназа Мак	Rv0127	560,7	77	47%	N/D	3	N/D	цитоплазма
вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0148	146,8	162	86%	34	N/D	4	цитоплазма

покоящиеся (П1)	короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0148	10,5	84	42%	34	N/D	4	цитоплазма
покоящиеся (П1)	короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0148	92,1	246	72%	25	10	N/D	мембраны
вегетативные	Фосфотирозиновая протеинфосфатаза РТВ (протеин-тирозин-фосфатаза) (PTPase)	Rv0153c	70,5	56	43%	N/D	N/D	16	мембраны
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE2	Rv0154c	32,1	198	46%	N/D	N/D	44	цитоплазма
вегетативные	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	12,9	248	83%	38	9	94	цитоплазма
вегетативные	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	15,8	72	43%	52	57	54	мембраны
покоящиеся (П1)	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	8,3	52	37%	38	9	94	цитоплазма
покоящиеся (П1)	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	31,2	167	46%	52	57	54	мембраны
покоящиеся (П2)	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	10,2	127	39%	52	57	54	мембраны
покоящиеся (П2)	НАД (Р) трансгидрогеназа (субъединица альфа) PntAa [каталитическая часть] (субъединица альфа пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы) (субъединица альфа никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы)	Rv0155	186,9	49	47%	38	9	94	цитоплазма
вегетативные	Белок семейства Mce Mce1A	Rv0169	9,5	56	42%	N/D	N/D	57	мембраны
вегетативные	Белок семейства Mce Mce1D	Rv0172	2,6	81	46%	N/D	N/D	95	мембраны
вегетативные	альтернативный сигма-фактор РНК-полимеразы SigG (сигма-фактор типа РНК-полимеразы ECF)	Rv0182c	36,2	45	49%	N/D	N/D	29	мембраны
вегетативные	Возможная лизофосфолипаза	Rv0183	10,7	199	92%	N/D	N/D	48	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная лизофосфолипаза	Rv0183	74,4	180	66%	35	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная регулируемая железом фосфоенолпируваткарбоксиаза [GTP] PckA (фосфоенолпируваткарбоксилаза) (PEPCK) (пеп-карбоксикиназа)	Rv0211	5,8	346	76%	N/D	7	130	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная регулируемая железом фосфоенолпируваткарбоксиаза [GTP] PckA (фосфоенолпируваткарбоксилаза) (PEPCK) (пеп-карбоксикиназа)	Rv0211	224,7	369	76%	N/D	7	130	цитоплазма
вегетативные	еноил-КоА гидратаза EcbA1 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv0222	8,8	196	94%	N/D	N/D	108	цитоплазма
вегетативные	альдегиддегидрогеназа	Rv0223c	2,5	212	68%	N/D	N/D	152	цитоплазма
вегетативные	Сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа [НАДФ +] зависимая (SSDH) GabD1	Rv0234c	5,5	481	89%	25	30	131	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа [НАДФ +] зависимая (SSDH) GabD1	Rv0234c	6,3	232	88%	25	30	131	цитоплазма

покоящиеся (П2)	Сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа [НАДФ +] зависимая (SSDH) GabD1	Rv0234c	46,6	72	46%	25	30	131	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LpqI	Rv0237	45,9	223	75%	N/D	N/D	24	мембраны
вегетативные	3-оксоацил- [белок-ацил-носитель] редуктаза FabG4 (редуктаза 3-кетоацилацил-носителя)	Rv0242c	50,6	425	87%	23	55	26	цитоплазма
вегетативные	3-оксоацил- [белок-ацил-носитель] редуктаза FabG4 (редуктаза 3-кетоацилацил-носителя)	Rv0242c	28,7	141	65%	76	40	34	мембраны
покоящиеся (П1)	3-оксоацил- [белок-ацил-носитель] редуктаза FabG4 (редуктаза 3-кетоацилацил-носителя)	Rv0242c	18,3	259	57%	23	55	26	цитоплазма
покоящиеся (П1)	3-оксоацил- [белок-ацил-носитель] редуктаза FabG4 (редуктаза 3-кетоацилацил-носителя)	Rv0242c	11,1	48	27%	76	40	34	мембраны
покоящиеся (П2)	3-оксоацил- [белок-ацил-носитель] редуктаза FabG4 (редуктаза 3-кетоацилацил-носителя)	Rv0242c	12,3	65	54%	23	55	26	цитоплазма
вегетативные	ацетил-КоА-ацилтрансфераза FadA2 (3-кетоацил-КоА тиолаза) (бета-кетотиолаза)	Rv0243	20,3	257	58%	N/D	N/D	69	цитоплазма
вегетативные	ацетил-КоА-ацилтрансфераза FadA2 (3-кетоацил-КоА тиолаза) (бета-кетотиолаза)	Rv0243	4,2	93	47%	N/D	N/D	82	мембраны
вегетативные	сукцинатдегидрогеназа	Rv0247c	89,4	284	79%	16	9	12	мембраны
покоящиеся (П1)	сукцинатдегидрогеназа	Rv0247c	140,3	157	31%	16	9	12	мембраны
покоящиеся (П2)	сукцинатдегидрогеназа	Rv0247c	108,8	266	72%	16	9	12	мембраны
вегетативные	сукцинатдегидрогеназа	Rv0248c	36,6	455	71%	20	39	28	мембраны
покоящиеся (П1)	сукцинатдегидрогеназа	Rv0248c	126,9	138	32%	20	39	28	мембраны
покоящиеся (П2)	сукцинатдегидрогеназа	Rv0248c	25,2	475	60%	20	39	28	мембраны
вегетативные	CoA-лигаза жирных кислот FadD2 (CoA-синтетаза жирных кислот) (CoA-синтаза жирных кислот)	Rv0270	7,3	536	86%	N/D	N/D	114	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE6	Rv0271c	2,2	386	74%	N/D	N/D	157	цитоплазма
вегетативные	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0281	3,3	443	91%	4	56	147	цитоплазма
вегетативные	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0281	16,8	130	66%	N/D	N/D	53	мембраны
покоящиеся (П1)	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0281	46,8	78	37%	4	56	147	цитоплазма
покоящиеся (П2)	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0281	11,1	277	88%	4	56	147	цитоплазма
вегетативные	Мембранный микозин МусР3 (сериновая протеаза) (субтилизин-подобная протеаза) (субтилазоподобная) (микозин-3)	Rv0291	3,6	164	59%	N/D	48	86	мембраны
покоящиеся (П1)	Мембранный микозин МусР3 (сериновая протеаза) (субтилизин-подобная протеаза) (субтилазоподобная) (микозин-3)	Rv0291	6,5	78	61%	42	N/D	31	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Мембранный микозин МусР3 (сериновая протеаза) (субтилизин-подобная протеаза) (субтилазоподобная) (микозин-3)	Rv0291	15,3	99	84%	N/D	48	86	мембраны
покоящиеся (П2)	сульфатаза	Rv0296c	39	65	72%	N/D	35	N/D	цитоплазма

вегетативные	пирролидонкарбоксилатпептидаза Pcp (5-оксопролилпептидаза) (пироглутамилпептидаза I) (PGP-I) (пираза)	Rv0319	75,2	82	73%	N/D	N/D	10	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0331	4,9	60	41%	49	47	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0331	21,7	77	55%	49	47	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Белок IniB, индуцируемый изониазидом	Rv0341	130,6	106	76%	2	3	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Белок IniB, индуцируемый изониазидом	Rv0341	54,2	88	75%	2	3	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	консервативный мембранный белок	Rv0347	5,9	88	68%	N/D	67	N/D	цитоплазма
вегетативные	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	136,9	663	85%	1	2	5	цитоплазма
вегетативные	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	8,2	428	83%	13	54	68	мембраны
покоящиеся (П1)	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	91,7	406	77%	1	2	5	цитоплазма
покоящиеся (П1)	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	226,4	335	59%	13	54	68	мембраны
покоящиеся (П2)	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	11,7	453	80%	13	54	68	мембраны
покоящиеся (П2)	шаперонный белок DnaK (белок теплового шока 70) (белок теплового шока 70 кДа) (HSP70)	Rv0350	634,8	135	58%	1	2	5	цитоплазма
вегетативные	белок GrpE (кофактор HSP-70)	Rv0351	46,1	233	98%	N/D	N/D	28	цитоплазма
покоящиеся (П2)	шаперонный белок DnaJ1	Rv0352	45,8	118	61%	N/D	23	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv0356c	11,9	100	69%	N/D	N/D	96	цитоплазма
вегетативные	консервативный мембранный белок	Rv0361	16,8	59	44%	N/D	N/D	53	мембраны
вегетативные	фруктозо-бисфосфатальдолаза Fba	Rv0363c	75,3	276	82%	12	13	9	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фруктозо-бисфосфатальдолаза Fba	Rv0363c	31,2	250	86%	12	13	9	цитоплазма
покоящиеся (П2)	фруктозо-бисфосфатальдолаза Fba	Rv0363c	144	313	86%	12	13	9	цитоплазма
вегетативные	АТФ-связывающая эндопептидазы (цепь В) ClpB (белок ClpB) (белок теплового шока F84.1)	Rv0384c	11	572	70%	N/D	N/D	101	цитоплазма
покоящиеся (П2)	АТФ-связывающая эндопептидазы (цепь В) ClpB (белок ClpB) (белок теплового шока F84.1)	Rv0384c	11,8	499	71%	N/D	53	N/D	мембраны
вегетативные	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Fgd1	Rv0407	18,1	261	79%	N/D	29	80	цитоплазма
вегетативные	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Fgd1	Rv0407	9,1	230	75%	N/D	N/D	63	мембраны
покоящиеся (П2)	F420-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Fgd1	Rv0407	48,3	76	71%	N/D	29	80	цитоплазма
вегетативные	Вероятный глутамин-связывающий липопропротеин GlnH (GLNBP)	Rv0411c	15,8	164	76%	N/D	N/D	54	мембраны
вегетативные	липопропротеин-аминопептидаза LpqL	Rv0418	11,3	356	86%	N/D	N/D	60	мембраны

вегетативные	экзодезоксирибонуклеаза III XthA (экзонуклеаза III) (EXO III)	Rv0427c	17,9	76	62%	N/D	N/D	81	цитоплазма
вегетативные	экзодезоксирибонуклеаза III XthA (экзонуклеаза III) (EXO III)	Rv0427c	25,8	49	39%	N/D	N/D	37	мембраны
вегетативные	N-ацетилтрансфераза	Rv0428c	35,3	71	70%	N/D	N/D	30	мембраны
вегетативные	Периплазматическая супероксиддисмутаза [Cu-Zn] SodC	Rv0432	209,8	141	84%	11	10	5	мембраны
покоящиеся (П1)	Периплазматическая супероксиддисмутаза [Cu-Zn] SodC	Rv0432	10,5	68	48%	34	N/D	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Периплазматическая супероксиддисмутаза [Cu-Zn] SodC	Rv0432	249,2	195	70%	11	10	5	мембраны
покоящиеся (П2)	Периплазматическая супероксиддисмутаза [Cu-Zn] SodC	Rv0432	102,1	63	50%	11	10	5	мембраны
вегетативные	консервативная АТФаза	Rv0435c	1,1	428	70%	N/D	N/D	159	цитоплазма
вегетативные	60 кДа шаперонин 2 GroEL2 (белок CPN60-2) (GroEL белок 2) (антиген 65 кДа) (белок теплового шока 65) (белок клеточной стенки А) (антиген А)	Rv0440	258,7	413	68%	9	2	3	цитоплазма
вегетативные	60 кДа шаперонин 2 GroEL2 (белок CPN60-2) (GroEL белок 2) (антиген 65 кДа) (белок теплового шока 65) (белок клеточной стенки А) (антиген А)	Rv0440	173,6	416	70%	10	11	7	мембраны
покоящиеся (П1)	60 кДа шаперонин 2 GroEL2 (белок CPN60-2) (GroEL белок 2) (антиген 65 кДа) (белок теплового шока 65) (белок клеточной стенки А) (антиген А)	Rv0440	249,9	177	40%	10	11	7	мембраны
покоящиеся (П2)	60 кДа шаперонин 2 GroEL2 (белок CPN60-2) (GroEL белок 2) (антиген 65 кДа) (белок теплового шока 65) (белок клеточной стенки А) (антиген А)	Rv0440	96,7	485	80%	10	11	7	мембраны
покоящиеся (П2)	60 кДа шаперонин 2 GroEL2 (белок CPN60-2) (GroEL белок 2) (антиген 65 кДа) (белок теплового шока 65) (белок клеточной стенки А) (антиген А)	Rv0440	634,8	209	63%	9	2	3	цитоплазма
вегетативные	Антисигма фактор RskA (регулятор сигмы К)	Rv0444c	0,9	126	83%	46	N/D	107	мембраны
покоящиеся (П1)	Антисигма фактор RskA (регулятор сигмы К)	Rv0444c	42,9	116	40%	46	N/D	107	мембраны
вегетативные	альдегиддегидрогеназа	Rv0458	2,5	406	79%	N/D	N/D	154	цитоплазма
покоящиеся (П1)	альдегиддегидрогеназа	Rv0458	461,9	161	28%	4	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Дигидролипоамиддегидрогеназа LpdC (липоамидредуктаза (НАДН)) (липоилдегидрогеназа) (дигидролипоилдегидрогеназа) (диафораза)	Rv0462	11,1	276	88%	7	63	100	цитоплазма
вегетативные	Дигидролипоамиддегидрогеназа LpdC (липоамидредуктаза (НАДН)) (липоилдегидрогеназа) (дигидролипоилдегидрогеназа) (диафораза)	Rv0462	17,7	164	28%	N/D	70	49	мембраны
покоящиеся (П1)	Дигидролипоамиддегидрогеназа LpdC (липоамидредуктаза (НАДН)) (липоилдегидрогеназа) (дигидролипоилдегидрогеназа) (диафораза)	Rv0462	42,9	114	59%	7	63	100	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Дигидролипоамиддегидрогеназа LpdC (липоамидредуктаза (НАДН)) (липоилдегидрогеназа) (дигидролипоилдегидрогеназа) (диафораза)	Rv0462	6,5	136	63%	N/D	70	49	мембраны
покоящиеся (П2)	Дигидролипоамиддегидрогеназа LpdC (липоамидредуктаза (НАДН)) (липоилдегидрогеназа) (дигидролипоилдегидрогеназа) (диафораза)	Rv0462	7,2	129	65%	7	63	100	цитоплазма
покоящиеся (П1)	3-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназа FadB2 (бета-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназа) (BHBD)	Rv0468	45,1	58	47%	45	N/D	N/D	мембраны

покоящиеся (П2)	3-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназа FadB2 (бета-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназа) (BHBD)	Rv0468	7,9	156	66%	N/D	62	46	цитоплазма
вегетативные	Синтаза миколовой кислоты PcaA (циклопропансинтаза)	Rv0470c	89,4	76	50%	N/D	N/D	12	мембраны
покоящиеся (П2)	короткоцепочечная оксидоредуктаза	Rv0484c	123,8	90	59%	N/D	7	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	фосфоглицератмутаза 1 Gpm1 (фосфоглицеромутаза) (PGAM)	Rv0489	10,5	70	36%	34	N/D	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Циклопропан-ацилфосфолипид-синтаза 2 SmaA2 (циклопропановая синтаза жирных кислот) (CFA-синтаза) (циклопропан-синтаза миколовой кислоты 2) (транс-циклопропансинтетаза миколовой кислоты)	Rv0503c	7,9	72	41%	N/D	62	N/D	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0525	23,3	78	64%	N/D	N/D	59	цитоплазма
вегетативные	пероксидаза BroC (негем-пероксидаза)	Rv0554	45	135	88%	N/D	N/D	30	цитоплазма
покоящиеся (П2)	пероксидаза BroC (негем-пероксидаза)	Rv0554	27,3	103	57%	N/D	38	N/D	мембраны
вегетативные	бифункциональный белок биосинтеза менахинона	Rv0555	4,1	354	62%	N/D	N/D	140	цитоплазма
вегетативные	метилтрансфераза / метилаза	Rv0567	22,9	95	52%	N/D	N/D	40	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv0571c	11,1	64	69%	N/D	N/D	100	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок TB27.3	Rv0577	52,5	132	51%	26	17	24	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Консервативный белок TB27.3	Rv0577	16,9	48	70%	26	17	24	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок TB27.3	Rv0577	112,7	174	70%	26	17	24	цитоплазма
вегетативные	еноил-КоА гидратаза EchA3 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv0632c	50,8	190	85%	22	66	25	цитоплазма
покоящиеся (П1)	еноил-КоА гидратаза EchA3 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv0632c	18,7	301	87%	22	66	25	цитоплазма
покоящиеся (П2)	еноил-КоА гидратаза EchA3 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv0632c	6,1	182	76%	22	66	25	цитоплазма
вегетативные	глиоксалаза II (гидроксиацилглютацион гидролаза) (GLX II)	Rv0634c	71,6	62	49%	N/D	N/D	13	цитоплазма
вегетативные	белок антитерминации транскрипции NusG	Rv0639	9,3	274	54%	N/D	N/D	105	цитоплазма
вегетативные	Синтаза метоксимиколовой кислоты 4 MmaA4 (синтаза метилмикеновой кислоты 4) (MMA4) (синтаза гидроксимиколовой кислоты)	Rv0642c	29,7	380	98%	N/D	N/D	32	мембраны
вегетативные	диоксигеназа	Rv0654	2,8	58	33%	N/D	N/D	150	цитоплазма
вегетативные	рибонуклеотид-транспортный АТФ-связывающий белок ABC-транспортер Mki	Rv0655	36,2	270	59%	89	40	29	мембраны
покоящиеся (П1)	рибонуклеотид-транспортный АТФ-связывающий белок ABC-транспортер Mki	Rv0655	4,9	124	44%	89	40	29	мембраны
покоящиеся (П2)	рибонуклеотид-транспортный АТФ-связывающий белок ABC-транспортер Mki	Rv0655	22,2	349	94%	89	40	29	мембраны

вегетативные	ДНК-направленная РНК-полимераза (бета-цепь) RpoВ (бета-цепь транскриптазы) (бета-субъединица РНК-полимеразы)	Rv0667	2,7	510	64%	17	69	94	мембраны
покоящиеся (П1)	ДНК-направленная РНК-полимераза (бета-цепь) RpoВ (бета-цепь транскриптазы) (бета-субъединица РНК-полимеразы)	Rv0667	137,3	381	45%	17	69	94	мембраны
покоящиеся (П2)	ДНК-направленная РНК-полимераза (бета-цепь) RpoВ (бета-цепь транскриптазы) (бета-субъединица РНК-полимеразы)	Rv0667	7,1	433	53%	17	69	94	мембраны
покоящиеся (П2)	ДНК-направленная РНК-полимераза (бета-цепь) RpoВ (бета-цепь транскриптазы) (бета-субъединица РНК-полимеразы)	Rv0667	9,8	461	57%	N/D	60	N/D	цитоплазма
вегетативные	эндонуклеаза IV End (эндодезоксирибонуклеаза IV) (апуриназа)	Rv0670	49,2	260	91%	N/D	N/D	27	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE8	Rv0672	4,2	121	41%	N/D	N/D	139	цитоплазма
вегетативные	фактор элонгации G FusA1 (EF-G)	Rv0684	3,8	532	76%	33	N/D	143	цитоплазма
вегетативные	фактор элонгации G FusA1 (EF-G)	Rv0684	9,8	472	77%	33	64	61	мембраны
покоящиеся (П1)	фактор элонгации G FusA1 (EF-G)	Rv0684	77,4	332	46%	33	64	61	мембраны
покоящиеся (П2)	фактор элонгации G FusA1 (EF-G)	Rv0684	9,5	342	62%	33	64	61	мембраны
вегетативные	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	395,3	399	85%	21	10	1	цитоплазма
вегетативные	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	387,8	531	90%	1	1	2	мембраны
покоящиеся (П1)	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	10,5	89	69%	21	10	1	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	947,1	267	64%	1	1	2	мембраны
покоящиеся (П2)	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	434	362	81%	1	1	2	мембраны
покоящиеся (П2)	фактор элонгации TU Tuf (EF-TU)	Rv0685	168,9	209	79%	21	10	1	цитоплазма
вегетативные	Предполагаемая ферредоксинредуктаза	Rv0688	11,4	251	76%	N/D	N/D	99	цитоплазма
вегетативные	Предполагаемая ферредоксинредуктаза	Rv0688	4,1	80	56%	N/D	N/D	84	мембраны
вегетативные	Возможная протеаза IV SppA (эндопептидаза IV) (сигнальная пептидная пептидаза)	Rv0724	2,8	285	66%	N/D	N/D	150	цитоплазма
покоящиеся (П1)	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0731c	18,8	148	69%	21	42	8	цитоплазма
покоящиеся (П2)	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv0731c	26,9	86	61%	21	42	8	цитоплазма
вегетативные	Аденилаткиназа Adk (АТФ-АМФ трансфосфорилаза)	Rv0733	18,8	94	46%	N/D	71	77	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Аденилаткиназа Adk (АТФ-АМФ трансфосфорилаза)	Rv0733	2,9	102	54%	N/D	71	77	цитоплазма
вегетативные	метилмалонат-полуальдегиддегидрогеназа MmsA (полуальдегиддегидрогеназа метилмалоновой кислоты) (MMSDH)	Rv0753c	16,5	525	89%	N/D	25	86	цитоплазма
покоящиеся (П2)	метилмалонат-полуальдегиддегидрогеназа MmsA (полуальдегиддегидрогеназа метилмалоновой кислоты) (MMSDH)	Rv0753c	62,1	321	73%	N/D	25	86	цитоплазма
вегетативные	транскрипционный регулятор двухкомпонентной системы PhoP	Rv0757	30,5	83	49%	28	15	31	мембраны

покоящиеся (П1)	транскрипционный регулятор двухкомпонентной системы PhoP	Rv0757	97,6	202	26%	28	15	31	мембраны
покоящиеся (П2)	транскрипционный регулятор двухкомпонентной системы PhoP	Rv0757	62,4	46	39%	28	15	31	мембраны
вегетативные	НАД-зависимая цинксодержащая алкогольдегидрогеназа AdhB	Rv0761c	9,7	173	71%	N/D	N/D	104	цитоплазма
покоящиеся (П2)	29 кДа антиген CFP29	Rv0798c	92,9	138	85%	N/D	21	N/D	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0811c	23,5	190	88%	N/D	N/D	38	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv0813c	11,5	80	68%	N/D	N/D	97	цитоплазма
вегетативные	тиосульфатсульфаттрансфераза CysA2 (роданеподобный белок) (тиосульфатцианид транссульфураза) (тиосульфаттиоттрансфераза)	Rv0815c	19,1	325	93%	32	24	74	цитоплазма
покоящиеся (П1)	тиосульфатсульфаттрансфераза CysA2 (роданеподобный белок) (тиосульфатцианид транссульфураза) (тиосульфаттиоттрансфераза)	Rv0815c	13,2	299	89%	32	24	74	цитоплазма
покоящиеся (П2)	тиосульфатсульфаттрансфераза CysA2 (роданеподобный белок) (тиосульфатцианид транссульфураза) (тиосульфаттиоттрансфераза)	Rv0815c	71,8	469	91%	32	24	74	цитоплазма
вегетативные	Транскрипционный регуляторный белок	Rv0818	19,4	85	70%	N/D	N/D	72	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Транскрипционный регуляторный белок	Rv0818	71,7	78	35%	38	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	десатураза DesA1 (ацил- [ACP] десатураза) (стеарил-ACP десатураза) (белок Des)	Rv0824c	27,2	250	87%	N/D	N/D	51	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0831c	23,7	70	55%	N/D	N/D	58	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0831c	79,8	435	95%	37	35	14	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv0831c	72,1	143	78%	37	35	14	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv0831c	29,9	394	95%	37	35	14	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятная пируват или индол-3-пируват декарбоксилаза Pdc	Rv0853c	1,5	277	75%	56	41	96	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная пируват или индол-3-пируват декарбоксилаза Pdc	Rv0853c	29,1	174	72%	56	41	96	цитоплазма
вегетативные	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	15,6	443	90%	18	18	90	цитоплазма
вегетативные	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	8,1	254	57%	30	25	70	мембраны
покоящиеся (П1)	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	22,7	264	84%	18	18	90	цитоплазма
покоящиеся (П1)	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	87,4	156	32%	30	25	70	мембраны
покоящиеся (П2)	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	43,2	244	75%	30	25	70	мембраны
покоящиеся (П2)	тиолаза ацил-KoA FadA	Rv0859	103,3	241	89%	18	18	90	цитоплазма
вегетативные	белок окисления жиров FadB	Rv0860	26,8	464	78%	58	N/D	53	цитоплазма
вегетативные	белок окисления жиров FadB	Rv0860	1,8	427	68%	66	32	102	мембраны

покоящиеся (П1)	белок окисления жиров FadB	Rv0860	0,9	374	66%	58	N/D	53	цитоплазма
покоящиеся (П1)	белок окисления жиров FadB	Rv0860	21,9	236	44%	66	32	102	мембраны
покоящиеся (П2)	белок окисления жиров FadB	Rv0860	32,6	382	75%	66	32	102	мембраны
вегетативные	фосфосерин-аминотрансфераза SerC (PSAT)	Rv0884c	11,4	66	68%	17	44	98	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фосфосерин-аминотрансфераза SerC (PSAT)	Rv0884c	23,1	181	89%	17	44	98	цитоплазма
покоящиеся (П2)	фосфосерин-аминотрансфераза SerC (PSAT)	Rv0884c	23,9	120	72%	17	44	98	цитоплазма
вегетативные	цитратсинтаза II CitA	Rv0889c	6,2	76	30%	N/D	N/D	73	мембраны
покоящиеся (П2)	цитрат-синтаза I GltA2	Rv0896	168,9	188	76%	N/D	10	N/D	цитоплазма
вегетативные	транскрипционный регуляторный белок PrrA двухкомпонентной системы	Rv0903c	18,8	66	63%	N/D	N/D	76	цитоплазма
покоящиеся (П1)	транскрипционный регуляторный белок PrrA двухкомпонентной системы	Rv0903c	111,9	95	52%	25	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	еноил-СоА гидратаза EchA6 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-СоА гидратаза) (кротоназа)	Rv0905	75,2	307	92%	N/D	N/D	10	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv0907	17,7	62	42%	N/D	N/D	49	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv0925c	8,8	89	43%	37	N/D	N/D	цитоплазма
вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv0927c	12,6	105	57%	N/D	N/D	95	цитоплазма
вегетативные	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS3 (PBP-3) (PstS3) (PHOS1)	Rv0928	22,9	167	62%	N/D	N/D	40	мембраны
вегетативные	Трансмембранная серин / треонин-протеинкиназа D PknD (протеинкиназа D) (STPK D)	Rv0931c	18,6	116	64%	N/D	N/D	78	цитоплазма
вегетативные	Трансмембранная серин / треонин-протеинкиназа D PknD (протеинкиназа D) (STPK D)	Rv0931c	70,5	62	53%	N/D	N/D	16	мембраны
покоящиеся (П1)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS2 (PBP-2) (PstS2)	Rv0932c	46,8	86	64%	4	N/D	N/D	цитоплазма
вегетативные	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	6,9	189	98%	4	11	117	цитоплазма
вегетативные	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	484,3	275	90%	7	20	1	мембраны
покоящиеся (П1)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	46,8	91	58%	4	11	117	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	304,5	159	65%	7	20	1	мембраны
покоящиеся (П2)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	54,2	157	69%	7	20	1	мембраны
покоящиеся (П2)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	147,3	167	86%	4	11	117	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Периплазматический фосфат-связывающий липопротеин PstS1 (PBP-1) (PstS1)	Rv0934	11,1	57	59%	4	11	117	цитоплазма

покоящиеся (П2)	глюкозо-6-фосфатизомераза Pgi (GPI) (фосфоглюкозоизомераза) (фосфогексоизомераза) (phi)	Rv0946c	62,1	125	47%	N/D	25	N/D	цитоплазма
вегетативные	сукцинил-КоА синтетаза (бета-цепь) SucC (SCS-бета)	Rv0951	6,8	163	79%	76	9	119	цитоплазма
покоящиеся (П1)	сукцинил-КоА синтетаза (бета-цепь) SucC (SCS-бета)	Rv0951	41,1	70	21%	49	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	сукцинил-КоА синтетаза (бета-цепь) SucC (SCS-бета)	Rv0951	186,9	58	46%	76	9	119	цитоплазма
вегетативные	сукцинил-КоА синтетаза (альфа-цепь) SucD (SCS-альфа)	Rv0952	74,7	324	93%	14	46	11	цитоплазма
покоящиеся (П1)	сукцинил-КоА синтетаза (альфа-цепь) SucD (SCS-альфа)	Rv0952	27	299	92%	14	46	11	цитоплазма
покоящиеся (П1)	сукцинил-КоА синтетаза (альфа-цепь) SucD (SCS-альфа)	Rv0952	42,9	72	26%	46	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	сукцинил-КоА синтетаза (альфа-цепь) SucD (SCS-альфа)	Rv0952	22,3	270	74%	14	46	11	цитоплазма
вегетативные	5'-фосфорибозилглицинамид формилтрансфераза PurN (GART) (трансформилаза gar) (5'-фосфорибозилглицинамид трансформилаза)	Rv0956	21,4	133	87%	N/D	N/D	64	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Регулятор персистенции микобактерий MRPA	Rv0981	32,4	54	62%	N/D	33	N/D	мембраны
вегетативные	белок биосинтеза молибдоптерина MoeA1	Rv0994	12,5	108	70%	N/D	N/D	59	мембраны
вегетативные	аргининдезиминая ArcA (adi) (ad) (аргининдигидролаза)	Rv1001	9,7	95	62%	N/D	18	104	цитоплазма
покоящиеся (П2)	аргининдезиминая ArcA (adi) (ad) (аргининдигидролаза)	Rv1001	103,3	64	51%	N/D	18	104	цитоплазма
вегетативные	Неизвестный белок	Rv1006	4,3	299	77%	75	N/D	80	мембраны
покоящиеся (П1)	Неизвестный белок	Rv1006	1,7	232	73%	56	41	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Неизвестный белок	Rv1006	11,2	178	72%	75	N/D	80	мембраны
покоящиеся (П2)	Неизвестный белок	Rv1006	29,1	49	55%	56	41	N/D	цитоплазма
вегетативные	рибозофосфатпирофосфокиназа PrsA (фосфорибозилпирофосфатсинтетаза) (PRPP синтетаза)	Rv1017c	27	98	61%	N/D	N/D	52	цитоплазма
вегетативные	рибозофосфатпирофосфокиназа PrsA (фосфорибозилпирофосфатсинтетаза) (PRPP синтетаза)	Rv1017c	135,5	74	53%	N/D	14	9	мембраны
покоящиеся (П2)	рибозофосфатпирофосфокиназа PrsA (фосфорибозилпирофосфатсинтетаза) (PRPP синтетаза)	Rv1017c	62,6	62	52%	N/D	14	9	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1021	38,7	118	76%	N/D	29	27	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv1021	37,5	64	62%	N/D	29	27	мембраны
вегетативные	энолаза Eno	Rv1023	7,5	306	84%	26	48	112	цитоплазма
вегетативные	энолаза Eno	Rv1023	8,1	422	80%	19	22	69	мембраны
покоящиеся (П1)	энолаза Eno	Rv1023	14	330	81%	26	48	112	цитоплазма
покоящиеся (П1)	энолаза Eno	Rv1023	129,5	115	12%	19	22	69	мембраны

покоящиеся (П2)	энолаза Eno	Rv1023	49,8	400	80%	19	22	69	мембраны
покоящиеся (П2)	энолаза Eno	Rv1023	19,5	295	75%	26	48	112	цитоплазма
покоящиеся (П1)	гипотетический белок	Rv1063c	83,9	76	53%	31	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	еноил-КоА гидратаза EchA9 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv1071c	22,2	141	73%	N/D	N/D	63	цитоплазма
покоящиеся (П2)	еноил-КоА гидратаза EchA9 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv1071c	10,8	69	57%	N/D	56	N/D	мембраны
вегетативные	бета-кетоацил-КоА тиолаза FadA3	Rv1074c	45,1	343	91%	39	12	29	цитоплазма
покоящиеся (П1)	бета-кетоацил-КоА тиолаза FadA3	Rv1074c	7,4	273	92%	39	12	29	цитоплазма
покоящиеся (П1)	бета-кетоацил-КоА тиолаза FadA3	Rv1074c	28,9	66	32%	56	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	бета-кетоацил-КоА тиолаза FadA3	Rv1074c	145,9	329	93%	39	12	29	цитоплазма
вегетативные	цистатинин-бета-синтаза Cbs (серинсульфгидраза) (бета-тионаза) (гемопротейн H-450)	Rv1077	10,5	433	85%	52	N/D	103	цитоплазма
покоящиеся (П1)	цистатинин-бета-синтаза Cbs (серинсульфгидраза) (бета-тионаза) (гемопротейн H-450)	Rv1077	4,3	246	83%	52	N/D	103	цитоплазма
вегетативные	Серин гидроксиметилтрансфераза 1 GlyA1	Rv1093	29,4	387	79%	N/D	N/D	46	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Серин гидроксиметилтрансфераза 1 GlyA1	Rv1093	10,8	377	81%	78	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	десатураза DesA2 (ацил- [ACP] десатураза) (стеароил-ACP десатураза)	Rv1094	92,9	90	68%	N/D	21	N/D	цитоплазма
вегетативные	фумараза (фумаратгидратаза) Fum	Rv1098c	28,8	470	85%	42	35	49	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фумараза (фумаратгидратаза) Fum	Rv1098c	6,5	191	59%	42	35	49	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фумараза (фумаратгидратаза) Fum	Rv1098c	42,1	83	14%	48	65	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	фумараза (фумаратгидратаза) Fum	Rv1098c	9,5	117	36%	48	65	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	фумараза (фумаратгидратаза) Fum	Rv1098c	39	114	52%	42	35	49	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv1109c	70,5	81	45%	39	N/D	16	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv1109c	68,6	120	19%	39	N/D	16	мембраны
покоящиеся (П2)	глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа Zwf1 (G6PD)	Rv1121	15,3	103	56%	N/D	48	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирующая Gnd2	Rv1122	6,5	101	82%	41	29	73	цитоплазма
покоящиеся (П2)	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирующая Gnd2	Rv1122	48,3	160	75%	41	29	73	цитоплазма
вегетативные	5-метилтетрагидроптероилтригутаат - гомоцистеинметилтрансфераза MetE	Rv1133c	16,6	432	78%	54	1	85	цитоплазма
вегетативные	5-метилтетрагидроптероилтригутаат - гомоцистеинметилтрансфераза MetE	Rv1133c	1,8	299	56%	N/D	63	103	мембраны

покоящиеся (П1)	5-метилтетрагидроптероилтригутаат - гомоцистеинметилтрансфераза MetE	Rv1133c	3,4	277	52%	54	1	85	цитоплазма
покоящиеся (П2)	5-метилтетрагидроптероилтригутаат - гомоцистеинметилтрансфераза MetE	Rv1133c	9,5	288	64%	N/D	63	103	мембраны
покоящиеся (П2)	5-метилтетрагидроптероилтригутаат - гомоцистеинметилтрансфераза MetE	Rv1133c	900,6	113	38%	54	1	85	цитоплазма
вегетативные	короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv1144	23,3	331	90%	N/D	N/D	59	цитоплазма
вегетативные	респираторная нитратредуктаза (бета-цепь) NarH	Rv1162	5,7	216	58%	N/D	N/D	75	мембраны
покоящиеся (П2)	N-ацетил-1-D-мио-инозитил-2-амино-2-дезоксиглюкопиранозид деацетилаза MshB (GlcNAc-Ins деацетилаза)	Rv1170	7,9	81	65%	N/D	62	46	цитоплазма
вегетативные	ферредоксин FdxC	Rv1177	37,8	124	47%	4	N/D	37	цитоплазма
вегетативные	CoA-лигаза жирных кислот FadD36 (CoA-синтетаза жирных кислот) (CoA- синтаза жирных кислот)	Rv1193	4,3	234	73%	N/D	N/D	138	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv1194c	19,3	69	40%	N/D	43	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	Белок семейства PPE PPE18	Rv1196	29,4	142	10%	54	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Тетрагидродипиколонат N-сукцинилтрансфераза DapD	Rv1201c	63,3	327	93%	N/D	N/D	17	цитоплазма
вегетативные	Тетрагидродипиколонат N-сукцинилтрансфераза DapD	Rv1201c	0,9	78	66%	N/D	N/D	107	мембраны
покоящиеся (П1)	сукцинилдаминопимелат десукцинилаза DapE	Rv1202	5,5	70	40%	47	N/D	77	цитоплазма
вегетативные	метилтрансфераза	Rv1220c	14,8	97	66%	N/D	N/D	92	цитоплазма
вегетативные	белок Mgr	Rv1229c	18,6	273	76%	N/D	N/D	78	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv1232c	22,7	323	68%	N/D	3	41	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv1232c	308,9	125	61%	N/D	3	41	мембраны
вегетативные	транспортер сахара АТФ-связывающий белок ABC, транспортер SugC	Rv1238	3,4	297	71%	84	N/D	89	мембраны
покоящиеся (П1)	транспортер сахара АТФ-связывающий белок ABC, транспортер SugC	Rv1238	7,5	89	44%	84	N/D	89	мембраны
вегетативные	малатдегидрогеназа Mdh	Rv1240	61,3	297	80%	9	23	18	цитоплазма
вегетативные	малатдегидрогеназа Mdh	Rv1240	29,1	50	29%	N/D	N/D	33	мембраны
покоящиеся (П1)	малатдегидрогеназа Mdh	Rv1240	39,2	49	67%	9	23	18	цитоплазма
покоящиеся (П2)	малатдегидрогеназа Mdh	Rv1240	85,3	180	74%	9	23	18	цитоплазма
вегетативные	Аденилилциклаза (АТФ-пирофосфат-лиаза) (аденилатциклаза)	Rv1264	15,8	117	62%	N/D	N/D	54	мембраны
вегетативные	Липопротеин LprA	Rv1270c	57,2	64	74%	38	N/D	21	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LprA	Rv1270c	113,3	241	74%	N/D	N/D	10	мембраны

вегетативные	периплазматический олигопептид-связывающий липопротеин OppA	Rv1280c	4,2	217	69%	N/D	N/D	81	мембраны
покоящиеся (П2)	Диаминопимелатдекарбоксилаза LysA (DAP декарбоксилаза)	Rv1293	14,7	90	57%	N/D	53	49	цитоплазма
вегетативные	гомосериндегидрогеназа ThrA	Rv1294	2	150	67%	N/D	N/D	100	мембраны
вегетативные	Треонинсинтаза ThrC	Rv1295	16,1	346	96%	N/D	N/D	88	цитоплазма
вегетативные	гомолог Rho фактора терминации транскрипции	Rv1297	7,1	379	62%	N/D	N/D	116	цитоплазма
вегетативные	гомолог Rho фактора терминации транскрипции	Rv1297	2,2	374	68%	N/D	N/D	98	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1301	57,2	105	76%	N/D	N/D	21	цитоплазма
вегетативные	альфа-цепь АТФ-синтазы AtpA	Rv1308	4,7	550	74%	N/D	N/D	135	цитоплазма
вегетативные	альфа-цепь АТФ-синтазы AtpA	Rv1308	48,6	503	74%	12	47	23	мембраны
покоящиеся (П1)	альфа-цепь АТФ-синтазы AtpA	Rv1308	233,0	545	74%	12	47	23	мембраны
покоящиеся (П2)	альфа-цепь АТФ-синтазы AtpA	Rv1308	16,5	479	74%	12	47	23	мембраны
вегетативные	гамма-цепь АТФ-синтазы AtpG	Rv1309	37,8	110	55%	N/D	N/D	36	цитоплазма
вегетативные	гамма-цепь АТФ-синтазы AtpG	Rv1309	29,7	168	65%	58	31	32	мембраны
покоящиеся (П1)	гамма-цепь АТФ-синтазы AtpG	Rv1309	27,6	103	65%	58	31	32	мембраны
покоящиеся (П2)	гамма-цепь АТФ-синтазы AtpG	Rv1309	34,9	58	54%	58	31	32	мембраны
вегетативные	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	6,5	510	89%	19	16	121	цитоплазма
вегетативные	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	40,3	631	93%	22	18	26	мембраны
покоящиеся (П1)	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	21,2	475	86%	19	16	121	цитоплазма
покоящиеся (П1)	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	124,4	365	68%	22	18	26	мембраны
покоящиеся (П2)	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	58,2	449	84%	22	18	26	мембраны
покоящиеся (П2)	бета-цепь АТФ-синтазы AtpD	Rv1310	126,5	151	62%	19	16	121	цитоплазма
вегетативные	ацетил-КоА ацетилтрансфераза FadA4 (ацетоацетил-КоА тиолаза)	Rv1323	6,9	250	94%	60	12	118	цитоплазма
покоящиеся (П2)	ацетил-КоА ацетилтрансфераза FadA4 (ацетоацетил-КоА тиолаза)	Rv1323	145,9	108	81%	60	12	118	цитоплазма
покоящиеся (П2)	глюканаза GlgE	Rv1327c	32,6	94	35%	N/D	32	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1339	29,3	42	79%	N/D	N/D	47	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LprF	Rv1368	217,9	175	58%	N/D	N/D	4	мембраны
вегетативные	трансфераза	Rv1377c	21	176	83%	N/D	N/D	66	цитоплазма

вегетативные	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	14,2	372	91%	51	31	93	цитоплазма
вегетативные	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	6,1	609	82%	15	50	74	мембраны
покоящиеся (П1)	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	4,5	163	74%	51	31	93	цитоплазма
покоящиеся (П1)	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	145,7	167	41%	15	50	74	мембраны
покоящиеся (П2)	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	14,2	70	52%	15	50	74	мембраны
покоящиеся (П2)	S-аденозилметионинсинтетаза MetK (mat) (AdoMet синтетаза) (метионин-аденозилтрансфераза)	Rv1392	45,5	261	88%	51	31	93	цитоплазма
вегетативные	рибулозо-фосфат-3-эпимераза Rpe (PPE) (R5P3E) (пентозо-5-фосфат 3-эпимераза)	Rv1408	8,9	57	44%	N/D	N/D	107	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LprG	Rv1411c	218,5	177	53%	N/D	N/D	3	мембраны
покоящиеся (П2)	альфа-цепь рибофлавинсинтазы RibC (RibE)	Rv1412	2,9	85	58%	N/D	71	N/D	цитоплазма
вегетативные	Гипотетический белок	Rv1422	27,2	117	68%	N/D	N/D	51	цитоплазма
вегетативные	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа Gap (GAPDH)	Rv1436	91,3	329	81%	N/D	N/D	8	цитоплазма
покоящиеся (П1)	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа Gap (GAPDH)	Rv1436	83,9	139	53%	31	27	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа Gap (GAPDH)	Rv1436	39,9	181	67%	31	27	N/D	мембраны
вегетативные	фосфоглицераткиназа Pgi	Rv1437	12,9	113	68%	N/D	9	94	цитоплазма
покоящиеся (П1)	фосфоглицераткиназа Pgi	Rv1437	31,2	136	11%	52	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	фосфоглицераткиназа Pgi	Rv1437	186,9	147	63%	N/D	9	94	цитоплазма
вегетативные	триозофосфатизомераза Tri (TIM)	Rv1438	29	325	97%	46	N/D	48	цитоплазма
покоящиеся (П1)	триозофосфатизомераза Tri (TIM)	Rv1438	5,7	206	79%	46	N/D	48	цитоплазма
вегетативные	6-фосфоглюконолактоназа DevB (6PGL)	Rv1445c	19,4	172	63%	N/D	N/D	73	цитоплазма
вегетативные	Предполагаемый белок цикла OXPP OrcA	Rv1446c	25,8	279	92%	N/D	N/D	37	мембраны
вегетативные	трансальдолаза Tal	Rv1448c	6,5	52	44%	43	16	115	цитоплазма
покоящиеся (П2)	трансальдолаза Tal	Rv1448c	126,5	78	33%	43	16	115	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Транскетолаза Tkt (TK)	Rv1449c	900,6	60	32%	N/D	1	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная хинонредуктаза Qor (НАДФН: хинонредуктаза)	Rv1454c	45,1	57	55%	45	29	N/D	мембраны
вегетативные	консервативный переносчик АТФ-связывающего белка ABC	Rv1463	10,7	169	85%	N/D	N/D	102	цитоплазма
вегетативные	Вероятная железо-регулируемая аконитат-гидратаза Asp (цитрат-гидролаза) (аконитаза)	Rv1475c	17,7	735	76%	7	22	82	цитоплазма

покоящиеся (П1)	Вероятная железо-регулируемая аконитат-гидратаза Asp (цитрат-гидролаза) (аконитаза)	Rv1475c	13,4	621	73%	7	22	82	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная железо-регулируемая аконитат-гидратаза Asp (цитрат-гидролаза) (аконитаза)	Rv1475c	85,5	503	64%	7	22	82	цитоплазма
вегетативные	Транскрипционный регулятор MoxR1	Rv1479	41,8	392	90%	N/D	N/D	33	цитоплазма
вегетативные	Транскрипционный регулятор MoxR1	Rv1479	138,4	122	77%	44	17	8	мембраны
покоящиеся (П1)	Транскрипционный регулятор MoxR1	Rv1479	47,3	300	78%	44	17	8	мембраны
покоящиеся (П2)	Транскрипционный регулятор MoxR1	Rv1479	58,6	292	80%	44	17	8	мембраны
вегетативные	НАДН-зависимая еноил-АСР редуктаза	Rv1484	20	256	92%	N/D	N/D	70	цитоплазма
вегетативные	НАДН-зависимая еноил-АСР редуктаза	Rv1484	30,5	139	61%	59	15	31	мембраны
покоящиеся (П1)	НАДН-зависимая еноил-АСР редуктаза	Rv1484	26,7	125	51%	59	15	31	мембраны
покоящиеся (П2)	НАДН-зависимая еноил-АСР редуктаза	Rv1484	62,4	157	75%	59	15	31	мембраны
вегетативные	Возможный экспортируемый консервативный белок	Rv1488	138,4	84	47%	57	17	8	мембраны
покоящиеся (П1)	Возможный экспортируемый консервативный белок	Rv1488	28,9	417	63%	57	17	8	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможный экспортируемый консервативный белок	Rv1488	58,6	94	41%	57	17	8	мембраны
вегетативные	AMP-лигаза FadD25	Rv1521	4,7	86	40%	N/D	N/D	133	цитоплазма
вегетативные	L-апарагиназа AnsA	Rv1538c	8	57	54%	N/D	N/D	111	цитоплазма
покоящиеся (П2)	кетонацилредуктаза	Rv1544	123,8	77	44%	N/D	7	N/D	мембраны
вегетативные	никотинат-нуклеотидпирифосфатаза NadC	Rv1596	5,9	190	78%	N/D	N/D	128	цитоплазма
вегетативные	гистидинолдегидрогеназа HisD (HDH)	Rv1599	2,5	49	41%	N/D	32	153	цитоплазма
покоящиеся (П2)	гистидинолдегидрогеназа HisD (HDH)	Rv1599	45,1	67	36%	N/D	32	153	цитоплазма
вегетативные	индол-3-глицеринфосфатсинтаза TrpC	Rv1611	8,8	97	69%	N/D	N/D	108	цитоплазма
вегетативные	триптофансинтаза, альфа-субъединица TrpA	Rv1613	3,1	129	69%	N/D	N/D	148	цитоплазма
вегетативные	пируваткиназа PycA	Rv1617	11,1	82	51%	N/D	36	100	цитоплазма
вегетативные	пируваткиназа PycA	Rv1617	17,7	80	45%	68	13	49	мембраны
покоящиеся (П1)	пируваткиназа PycA	Rv1617	20,3	118	27%	68	13	49	мембраны
покоящиеся (П2)	пируваткиназа PycA	Rv1617	80,3	58	54%	68	13	49	мембраны
покоящиеся (П2)	пируваткиназа PycA	Rv1617	37,3	85	71%	N/D	36	100	цитоплазма
вегетативные	транскрипционный регулятор двухкомпонентной системы	Rv1626	18,8	212	90%	N/D	N/D	76	цитоплазма

вегетативные	ДНК-полимераза I PolA	Rv1629	2,9	720	77%	N/D	N/D	92	мембраны
покоящиеся (П1)	30S рибосомный белок S1 RosA	Rv1630	54,9	293	57%	40	55	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	30S рибосомный белок S1 RosA	Rv1630	11,1	320	74%	40	55	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1637c	146,8	73	89%	12	N/D	4	цитоплазма
вегетативные	фенилаланил-тРНК синтетаза, альфа-цепь PheS	Rv1649	45,9	47	37%	N/D	N/D	24	мембраны
вегетативные	N-ацетил-гамма-глутамилфосфатредуктаза ArgC	Rv1652	18,4	161	86%	N/D	N/D	79	цитоплазма
вегетативные	глутамат-N-ацетилтрансфераза ArgJ	Rv1653	24,6	169	77%	N/D	N/D	56	цитоплазма
вегетативные	аргининосукцинатсинтаза ArgG	Rv1658	22,9	359	81%	26	42	39	мембраны
покоящиеся (П1)	аргининосукцинатсинтаза ArgG	Rv1658	104,1	121	39%	26	42	39	мембраны
покоящиеся (П2)	аргининосукцинатсинтаза ArgG	Rv1658	20,2	92	76%	26	42	39	мембраны
покоящиеся (П2)	аргининосукцинатсинтаза ArgG	Rv1658	14,7	61	57%	N/D	53	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	катехол-О-метилтрансфераза	Rv1703c	108,8	94	67%	N/D	9	N/D	мембраны
вегетативные	Предполагаемый белок-ингибитор инициации	Rv1708	0,9	95	65%	N/D	N/D	107	мембраны
вегетативные	Conserved protein	Rv1732c	18,8	110	68%	10	N/D	66	цитоплазма
вегетативные	Conserved protein	Rv1732c	21	49	51%	10	N/D	66	цитоплазма
вегетативные	Anchored-membrane serine/threonine-protein kinase PknF (protein kinase F) (STPK F)	Rv1746	6,8	291	52%	N/D	N/D	72	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1770	23,5	197	83%	N/D	N/D	38	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1794	8	268	94%	N/D	N/D	111	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv1794	16,8	161	58%	51	N/D	53	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv1794	32,5	212	64%	51	N/D	53	мембраны
вегетативные	ацетолактатсинтаза IlvG (ацетогидроксикислотная синтаза) (ALS)	Rv1820	2,8	88	46%	N/D	N/D	150	цитоплазма
вегетативные	препротеин-транслоказа АТФаза SecA2	Rv1821	1,9	463	69%	N/D	64	101	мембраны
покоящиеся (П2)	препротеин-транслоказа АТФаза SecA2	Rv1821	9,5	43	31%	N/D	64	101	мембраны
вегетативные	Консервативный белок с доменом FHA, GarA	Rv1827	71,7	273	78%	6	N/D	12	цитоплазма
вегетативные	Малатсинтаза G GlcB	Rv1837c	4,7	332	78%	45	1	134	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Малатсинтаза G GlcB	Rv1837c	5,8	242	78%	45	1	134	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Малатсинтаза G GlcB	Rv1837c	900,6	191	59%	45	1	134	цитоплазма

вегетативные	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа GuaB1	Rv1843c	23,1	446	82%	N/D	N/D	61	цитоплазма
вегетативные	Возможная оксидоредуктаза	Rv1856c	39,2	59	67%	N/D	N/D	35	цитоплазма
вегетативные	Богатый аланином и пролином секретируемый белок Ара (фибронектин-прикрепляющий белок) (иммуногенный белок MPT32) (антиген MPT-32) (гликопротеин 45 кДа) (антиген 45/47 кДа)	Rv1860	16,6	132	60%	7	N/D	84	цитоплазма
вегетативные	Вероятная алкогольдегидрогеназа AdhA	Rv1862	15,6	129	58%	N/D	N/D	89	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv1867	4,2	271	66%	N/D	N/D	139	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная редуктаза	Rv1869c	28,9	149	50%	56	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможная L-лактатдегидрогеназа LldD2	Rv1872c	21,1	404	75%	N/D	41	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	бактериоферритин BfrA	Rv1876	38,4	93	64%	N/D	28	N/D	мембраны
вегетативные	Секретируемый антиген 85-В FbpB (85В) (комплекс антигена 85 В) (миколилтрансфераза 85В) (фибронектин-связывающий белок В) (внеклеточный альфа-антиген)	Rv1886c	71,6	101	54%	8	21	13	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Секретируемый антиген 85-В FbpB (85В) (комплекс антигена 85 В) (миколилтрансфераза 85В) (фибронектин-связывающий белок В) (внеклеточный альфа-антиген)	Rv1886c	41,7	150	56%	8	21	13	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Секретируемый антиген 85-В FbpB (85В) (комплекс антигена 85 В) (миколилтрансфераза 85В) (фибронектин-связывающий белок В) (внеклеточный альфа-антиген)	Rv1886c	92,9	178	62%	8	21	13	цитоплазма
вегетативные	Каталаза-пероксидаза-пероксинитритаза T KatG	Rv1908c	16,6	64	45%	45	1	85	цитоплазма
вегетативные	Каталаза-пероксидаза-пероксинитритаза T KatG	Rv1908c	1,8	63	35%	N/D	63	103	мембраны
покоящиеся (П1)	Каталаза-пероксидаза-пероксинитритаза T KatG	Rv1908c	5,8	89	60%	45	1	85	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Каталаза-пероксидаза-пероксинитритаза T KatG	Rv1908c	9,5	58	37%	N/D	63	103	мембраны
покоящиеся (П2)	Каталаза-пероксидаза-пероксинитритаза T KatG	Rv1908c	900,6	218	62%	45	1	85	цитоплазма
вегетативные	Консервативный липопротеин	Rv1922	21,5	95	42%	N/D	N/D	42	мембраны
вегетативные	ацил-КоА-лигаза FadD31 (ацил-КоА-синтетаза) (ацил-КоА-синтаза)	Rv1925	26,8	113	52%	N/D	N/D	53	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА-лигаза FadD31 (ацил-КоА-синтетаза) (ацил-КоА-синтаза)	Rv1925	36,6	79	47%	66	32	28	мембраны
покоящиеся (П1)	ацил-КоА-лигаза FadD31 (ацил-КоА-синтетаза) (ацил-КоА-синтаза)	Rv1925	21,9	162	18%	66	32	28	мембраны
покоящиеся (П2)	ацил-КоА-лигаза FadD31 (ацил-КоА-синтетаза) (ацил-КоА-синтаза)	Rv1925	32,6	100	45%	66	32	28	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv1978	44,2	99	56%	N/D	N/D	31	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv1978	35,3	339	85%	N/D	N/D	30	мембраны
вегетативные	Иммуногенный белок Mpt64 (антиген Mpt64 / MPB64)	Rv1980c	71,3	223	94%	13	N/D	14	цитоплазма

вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	Rv1996	27,6	383	93%	N/D	N/D	50	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv2004c	14,1	104	39%	N/D	N/D	56	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv2018	46	100	74%	5	N/D	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2018	54,2	135	48%	N/D	21	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Белок теплового шока HspX (гомолог альфа-кристаллина) (антиген 14 кДа) (HSP16.3)	Rv2031c	5,7	105	64%	N/D	68	N/D	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок Aсg	Rv2032	18,1	80	66%	N/D	N/D	80	цитоплазма
вегетативные	Бета-лактамаза класса A BlaC	Rv2068c	20,3	356	69%	N/D	N/D	45	мембраны
вегетативные	Вероятная 5'-3' экзонуклеаза	Rv2090	17,4	103	59%	N/D	N/D	51	мембраны
покоящиеся (П1)	фактор протеасомы B PafB	Rv2096c	6,2	73	42%	85	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Альфа-субъединица протеасомы PrcA; собирается с бета-субъединицей PrcB.	Rv2109c	36	245	91%	37	N/D	39	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Альфа-субъединица протеасомы PrcA; собирается с бета-субъединицей PrcB.	Rv2109c	8,8	275	89%	37	N/D	39	цитоплазма
вегетативные	Бета-субъединица протеасомы PrcB; собирается с альфа-субъединицей PrcA.	Rv2110c	8,1	96	83%	24	N/D	110	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Бета-субъединица протеасомы PrcB; собирается с альфа-субъединицей PrcA.	Rv2110c	17,5	94	57%	24	N/D	110	цитоплазма
вегетативные	Деамидаза	Rv2112c	64,5	135	80%	N/D	N/D	17	мембраны
вегетативные	Деамидаза	Rv2112c	5,5	160	49%	N/D	N/D	17	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv2114	11,5	66	68%	N/D	N/D	97	цитоплазма
вегетативные	Микобактериальная протеасома АТФаза Mpa	Rv2115c	3,2	448	66%	N/D	N/D	90	мембраны
вегетативные	Монофосфатаза CysQ	Rv2131c	71,6	72	52%	N/D	N/D	13	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv2135c	10,7	83	82%	N/D	N/D	102	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок TB18.6	Rv2140c	9,2	116	73%	N/D	61	N/D	цитоплазма
вегетативные	Семейство протеинов Diviva Wag31	Rv2145c	41,2	360	88%	21	19	34	цитоплазма
вегетативные	Семейство протеинов Diviva Wag31	Rv2145c	20,3	85	46%	62	N/D	44	мембраны
покоящиеся (П1)	Семейство протеинов Diviva Wag31	Rv2145c	18,8	141	73%	21	19	34	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Семейство протеинов Diviva Wag31	Rv2145c	24,9	169	63%	62	N/D	44	мембраны
покоящиеся (П2)	Семейство протеинов Diviva Wag31	Rv2145c	102,2	114	50%	21	19	34	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок YfiH	Rv2149c	20	163	85%	N/D	N/D	70	цитоплазма
вегетативные	UDP-N-ацетилмурамоилаланил-D-глутамил-2,6-диаминопимелат-D-аланил-D-аланиллигаза MurF	Rv2157c	17,7	61	67%	68	N/D	49	мембраны

покоящиеся (П1)	UDP-N-ацетилмурамоилаланил-D-глутамил-2,6-диаминопимелат-D-аланил-D-аланиллигаза MurF	Rv2157c	20,3	116	36%	68	N/D	49	мембраны
покоящиеся (П1)	UDP-N-ацетилмурамоилаланил-D-глутамат-2,6-диаминопимелатлигаза MurE	Rv2158c	5,2	246	60%	80	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2161c	62,4	95	64%	N/D	15	N/D	мембраны
вегетативные	3-дезоксид-арабино-гептулозонат 7-фосфатсинтаза AroG (DAHП синтаза, репрессируемая фенилаланином)	Rv2178c	17,7	318	86%	N/D	13	49	мембраны
покоящиеся (П2)	3-дезоксид-арабино-гептулозонат 7-фосфатсинтаза AroG (DAHП синтаза, репрессируемая фенилаланином)	Rv2178c	80,3	89	51%	N/D	13	49	мембраны
покоящиеся (П2)	3-дезоксид-арабино-гептулозонат 7-фосфатсинтаза AroG (DAHП синтаза, репрессируемая фенилаланином)	Rv2178c	37,3	150	85%	N/D	36	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Аденозинкиназа	Rv2202c	21,1	237	25%	67	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Аденозинкиназа	Rv2202c	16,6	188	81%	N/D	51	N/D	цитоплазма
вегетативные	никотинат-нуклеотид-диметилбензимидазолфосфорибозилтрансфераза CobT	Rv2207	4	113	52%	N/D	N/D	141	цитоплазма
вегетативные	Вероятная аминотилтрансфераза GcvT (Т-белок системы расщепления глицина)	Rv2211c	23,8	124	58%	41	29	57	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная аминотилтрансфераза GcvT (Т-белок системы расщепления глицина)	Rv2211c	6,5	81	51%	41	29	57	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная аминотилтрансфераза GcvT (Т-белок системы расщепления глицина)	Rv2211c	48,3	57	40%	41	29	57	цитоплазма
вегетативные	Вероятная аминопептидаза PerB	Rv2213	63,8	398	71%	N/D	N/D	19	мембраны
вегетативные	DlaT, дигидролипоамидацилтрансфераза, компонент E2 пируватдегидрогеназы	Rv2215	19,8	485	77%	N/D	N/D	71	цитоплазма
покоящиеся (П1)	DlaT, дигидролипоамидацилтрансфераза, компонент E2 пируватдегидрогеназы	Rv2215	73,4	128	7%	36	74	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	DlaT, дигидролипоамидацилтрансфераза, компонент E2 пируватдегидрогеназы	Rv2215	4,2	402	68%	36	74	N/D	мембраны
вегетативные	Глутамин синтаза GlnA1 (глутаминсинтаза) (GS-I)	Rv2220	2,5	204	65%	25	3	122	цитоплазма
вегетативные	Глутамин синтаза GlnA1 (глутаминсинтаза) (GS-I)	Rv2220	12,5	171	71%	N/D	6	48	мембраны
покоящиеся (П1)	Глутамин синтаза GlnA1 (глутаминсинтаза) (GS-I)	Rv2220	17,2	277	88%	25	3	122	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Глутамин синтаза GlnA1 (глутаминсинтаза) (GS-I)	Rv2220	125,3	279	80%	N/D	6	48	мембраны
покоящиеся (П2)	Глутамин синтаза GlnA1 (глутаминсинтаза) (GS-I)	Rv2220	447,5	408	93%	25	3	122	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная глутамин синтаза Gcn2 (глутамин синтаза) (GS-II)	Rv2222c	39	208	69%	N/D	35	N/D	цитоплазма
вегетативные	Вероятная карбоксилэстераза SaeA	Rv2224c	64,5	169	79%	N/D	N/D	17	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv2226	4,9	84	45%	N/D	N/D	77	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv2229c	45	42	62%	N/D	N/D	30	цитоплазма

вегетативные	Консервативный белок	Rv2230c	6,9	66	41%	N/D	N/D	118	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Пируватдегидрогеназа E1, компонент AceE (пируватдекарбоксилаза) (пируватдегидрогеназа) (пировиноградная дегидрогеназа)	Rv2241	10,3	85	42%	35	N/D	71	цитоплазма
вегетативные	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 1 KasA (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS I)	Rv2245	20,4	369	94%	N/D	N/D	68	цитоплазма
вегетативные	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 1 KasA (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS I)	Rv2245	9,5	137	83%	N/D	16	57	мембраны
покоящиеся (П2)	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 1 KasA (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS I)	Rv2245	61,1	72	57%	N/D	16	57	мембраны
вегетативные	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 2 KasB (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS II)	Rv2246	23,2	396	82%	26	42	60	цитоплазма
покоящиеся (П1)	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 2 KasB (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS II)	Rv2246	104,1	62	32%	26	42	60	мембраны
покоящиеся (П2)	3-оксоацил- [белок-носитель ацила] синтаза 2 KasB (бета-кетоацил-АCP синтаза) (KAS II)	Rv2246	18,2	148	71%	26	42	60	мембраны
вегетативные	Возможный флавопротеин	Rv2250A	2,3	209	64%	N/D	N/D	156	цитоплазма
вегетативные	Возможный белок, регулирующий транскрипцию	Rv2258c	29,1	69	35%	N/D	N/D	33	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможный белок, регулирующий транскрипцию	Rv2258c	16,6	95	32%	N/D	51	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	S-нитросомикотиолредуктаза MscR	Rv2259	24,1	151	87%	N/D	43	N/D	цитоплазма
вегетативные	Консервативный гипотетический белок	Rv2260	34,7	88	90%	N/D	N/D	40	цитоплазма
вегетативные	Вероятная дегидрогеназа	Rv2280	7,1	136	65%	N/D	16	115	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная дегидрогеназа	Rv2280	126,5	130	62%	N/D	16	115	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная аминотрансфераза	Rv2294	8,5	93	41%	82	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная галогеналкандегалогеназа	Rv2296	44,2	229	83%	N/D	N/D	31	цитоплазма
вегетативные	Вероятная галогеналкандегалогеназа	Rv2296	49,6	333	96%	79	36	22	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятная галогеналкандегалогеназа	Rv2296	9,6	351	69%	79	36	22	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятная галогеналкандегалогеназа	Rv2296	29,1	293	69%	79	36	22	мембраны
вегетативные	Вероятный шаперонный белок HtpG (белок теплового шока) (белок семейства HSP90) (высокотемпературный белок G)	Rv2299c	4,4	450	82%	61	75	79	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятный шаперонный белок HtpG (белок теплового шока) (белок семейства HSP90) (высокотемпературный белок G)	Rv2299c	26,2	253	44%	61	75	79	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятный шаперонный белок HtpG (белок теплового шока) (белок семейства HSP90) (высокотемпературный белок G)	Rv2299c	0,8	367	65%	61	75	79	мембраны
вегетативные	Неизвестный белок	Rv2305	3,4	82	44%	N/D	N/D	89	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv2314c	3,8	210	63%	53	16	N/D	цитоплазма

покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2314c	126,5	65	55%	53	16	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Цистеинсинтаза а CysK1 (О-ацетилсеринсульфгидрилаза А) (О-ацетилсерин (тиол) -лиаза А) (CSASE А)	Rv2334	7,9	78	41%	N/D	62	46	цитоплазма
вегетативные	Белок PPE38 семейства PPE	Rv2352c	8,4	78	39%	N/D	N/D	66	мембраны
вегетативные	Вероятный шаперонный белок DnaJ2	Rv2373c	28,7	98	57%	N/D	N/D	34	мембраны
вегетативные	Вероятный белок теплового шока HrcA, репрессор транскрипции	Rv2374c	38,7	130	68%	N/D	N/D	27	мембраны
вегетативные	Вероятная 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатредуктаза CysH (PAPS-редуктаза, тиоредоксин DEP.) (Падопс-редуктаза) (3'-фосфоаденилсульфатредуктаза) (PAPS-сульфотрансфераза)	Rv2392	34,7	90	67%	N/D	N/D	40	цитоплазма
вегетативные	гипотетический белок	Rv2411c	4,7	119	52%	N/D	N/D	133	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv2417c	20,8	79	56%	N/D	N/D	67	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная оксидоредуктаза (альфа-субъединица)	Rv2455c	51,9	105	32%	41	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная АТФ-зависимая протеолитическая субъединица протеолитической субъединицы 2 CLP ClpP2 (эндопептидаза CLP 2)	Rv2460c	89,4	236	75%	N/D	30	13	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятная АТФ-зависимая протеолитическая субъединица протеолитической субъединицы 2 CLP ClpP2 (эндопептидаза CLP 2)	Rv2460c	35,1	215	60%	N/D	30	13	мембраны
вегетативные	Вероятный триггерный фактор (TF) белка Tig	Rv2462c	32,3	436	87%	N/D	N/D	42	цитоплазма
вегетативные	Вероятный триггерный фактор (TF) белка Tig	Rv2462c	1,6	346	74%	N/D	N/D	104	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv2466c	10,5	112	82%	34	N/D	N/D	цитоплазма
вегетативные	Вероятный транспортер макролидов, АТФ-связывающий белок, транспортер ABC	Rv2477c	26,2	582	82%	63	60	35	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятный транспортер макролидов, АТФ-связывающий белок, транспортер ABC	Rv2477c	24,4	168	28%	63	60	35	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятный транспортер макролидов, АТФ-связывающий белок, транспортер ABC	Rv2477c	9,8	190	47%	63	60	35	мембраны
вегетативные	Вероятная еноил-КоА гидратаза EchA14 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv2486	75,2	47	45%	N/D	N/D	10	цитоплазма
вегетативные	Вероятная цитрат (про-3S) -лиаза (бета-субъединица) CitE (цитраза) (цитратаза) (цитриттаза) (цитридсмолаза) (цитраза альдолаза)	Rv2498c	36	70	59%	N/D	N/D	39	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE19 (MMGC)	Rv2500c	36,2	52	39%	N/D	N/D	29	мембраны
покоящиеся (П1)	альфа-цепь ацетил- / пропионил-кофермента А карбоксилазы (альфа-субъединица) AccA1	Rv2501c	51,9	83	28%	41	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	ацетил- / пропионил-КоА карбоксилаза (бета-субъединица) AccD1	Rv2502c	6,1	166	61%	N/D	N/D	126	цитоплазма
покоящиеся (П2)	сукцинил-КоА: трансфераза 3-кетокислоты-кофермента А (бета-субъединица) ScoB (3-оксокислота: трансфераза КоА) (ОХСТ В) (сукцинил-КоА: 3-оксокислота КоА-трансфераза)	Rv2503c	2,9	94	48%	N/D	71	N/D	цитоплазма
вегетативные	фактор элонгации P Efr	Rv2534c	100	92	81%	N/D	N/D	7	цитоплазма

вегетативные	пептидаза PerQ	Rv2535c	23,8	92	84%	41	29	57	цитоплазма
покоящиеся (П1)	пептидаза PerQ	Rv2535c	6,5	82	33%	41	29	57	цитоплазма
покоящиеся (П2)	пептидаза PerQ	Rv2535c	48,3	71	47%	41	29	57	цитоплазма
вегетативные	аланил-тРНК синтетаза AlaS (аланин-тРНК лигаза) (аланин-транслаза) (ALARS)	Rv2555c	2,9	634	68%	N/D	N/D	93	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv2557	57,2	101	71%	38	38	21	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2557	32,2	128	86%	38	38	21	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv2558	50,8	62	51%	N/D	N/D	25	цитоплазма
вегетативные	транспортный АТФ-связывающий белок глутамин АВС-переносчик GlnQ	Rv2564	17,6	164	74%	83	N/D	50	мембраны
покоящиеся (П1)	транспортный АТФ-связывающий белок глутамин АВС-переносчик GlnQ	Rv2564	8,4	118	48%	83	N/D	50	мембраны
вегетативные	галогеналкандегалогеназа DhaA (1-хлоргексангалидогидролаза)	Rv2579	30,9	71	47%	N/D	N/D	45	цитоплазма
вегетативные	Возможная глиоксалаза II (гидроксиацилглутатион гидролаза) (GLX II)	Rv2581c	217,9	72	47%	N/D	N/D	4	мембраны
покоящиеся (П2)	ацил-КоА тиюэстераза II TesB2 (TEII)	Rv2605c	62,6	84	52%	N/D	14	N/D	мембраны
вегетативные	Возможный белок биосинтеза пиридоксина SnzP	Rv2606c	55,1	107	90%	15	69	22	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможный белок биосинтеза пиридоксина SnzP	Rv2606c	24,8	83	35%	15	69	22	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможный белок биосинтеза пиридоксина SnzP	Rv2606c	5,6	55	46%	15	69	22	цитоплазма
вегетативные	Вероятная пиридоксамин 5'-фосфатоксидаза PdxH (PNP / PMP оксидаза) (пиридоксинфосфатоксидаза) (PNPOX) (пиридоксин 5'-фосфатоксидаза)	Rv2607	25,1	90	62%	N/D	N/D	55	цитоплазма
вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков TB31.7	Rv2623	131,9	287	81%	40	N/D	6	цитоплазма
покоящиеся (П1)	белок семейства универсальных стрессовых белков TB31.7	Rv2623	6,7	86	51%	40	N/D	6	цитоплазма
покоящиеся (П1)	белок семейства универсальных стрессовых белков TB31.7	Rv2623	49,7	123	29%	34	31	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	белок семейства универсальных стрессовых белков TB31.7	Rv2623	34,9	60	53%	34	31	N/D	мембраны
вегетативные	белок семейства универсальных стрессовых белков	Rv2624c	20,8	273	91%	N/D	N/D	67	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv2629	6,2	146	75%	N/D	27	73	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2629	39,9	83	45%	N/D	27	73	мембраны
вегетативные	Возможная секретируемая протеаза	Rv2672	40,8	265	84%	N/D	N/D	25	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv2675c	43,3	52	45%	N/D	24	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv2680	46,1	92	67%	N/D	N/D	28	цитоплазма
вегетативные	Вероятная 1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза Dxs1 (1-дезоксидулозо-5-фосфатсинтаза) (DXP-синтаза) (DXPS)	Rv2682c	5,7	120	47%	N/D	N/D	75	мембраны

вегетативные	Белок захвата калия системы TRK CeoB	Rv2691	23,3	127	64%	N/D	N/D	59	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2696c	9,1	68	48%	N/D	N/D	63	мембраны
вегетативные	Железозависимый репрессор и активатор IdeR	Rv2711	146,8	67	69%	12	N/D	4	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Железозависимый репрессор и активатор IdeR	Rv2711	92,1	62	48%	29	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2714	6,9	201	81%	N/D	N/D	117	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2721c	1,5	284	73%	60	67	105	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный трансмембранный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2721c	26,4	121	44%	60	67	105	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный трансмембранный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2721c	8,1	122	44%	60	67	105	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный трансмембранный белок, богатый аланином, глицином и валином	Rv2721c	16,6	61	42%	41	51	55	цитоплазма
вегетативные	Вероятная диаминопимелатэпимераза DapF (DAP-эпимераза)	Rv2726c	23,7	72	42%	N/D	N/D	58	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок, богатый аланином	Rv2728c	11,5	130	81%	N/D	N/D	97	цитоплазма
вегетативные	Белок RecA (рекомбиназа А)	Rv2737c	45,9	117	37%	N/D	N/D	24	мембраны
вегетативные	белок с высоким содержанием аланина 35 кДа	Rv2744c	25,7	381	88%	6	N/D	54	цитоплазма
вегетативные	белок с высоким содержанием аланина 35 кДа	Rv2744c	135,5	381	96%	6	2	9	мембраны
покоящиеся (П1)	белок с высоким содержанием аланина 35 кДа	Rv2744c	44,8	189	60%	6	N/D	54	цитоплазма
покоящиеся (П1)	белок с высоким содержанием аланина 35 кДа	Rv2744c	377,2	250	89%	6	2	9	мембраны
покоящиеся (П2)	белок с высоким содержанием аланина 35 кДа	Rv2744c	351,1	280	79%	6	2	9	мембраны
вегетативные	Вероятная дигидродипиколинатсинтаза DapA (DHDPS) (дигидродипиколинатсинтаза)	Rv2753c	29,3	95	69%	N/D	N/D	47	цитоплазма
вегетативные	гидролаза с высоким содержанием аланина	Rv2765	18,8	126	76%	N/D	N/D	76	цитоплазма
вегетативные	Дигидродипиколинатредуктаза DapB (DHPR)	Rv2773c	39,2	166	79%	N/D	N/D	35	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Дигидродипиколинатредуктаза DapB (DHPR)	Rv2773c	43,3	96	77%	N/D	24	N/D	мембраны
вегетативные	Секретируемая L-аланиндегидрогеназа Ald (антиген 40 кДа) (TB43)	Rv2780	262,3	373	95%	N/D	55	2	цитоплазма
вегетативные	Секретируемая L-аланиндегидрогеназа Ald (антиген 40 кДа) (TB43)	Rv2780	17,4	156	73%	N/D	N/D	51	мембраны
покоящиеся (П2)	Секретируемая L-аланиндегидрогеназа Ald (антиген 40 кДа) (TB43)	Rv2780	12,3	216	88%	N/D	55	2	цитоплазма
покоящиеся (П1)	еноил-КоА гидратаза EchA16 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv2831	10,5	90	75%	34	N/D	N/D	цитоплазма
вегетативные	Возможная хелатаза магния	Rv2850c	6,2	144	58%	N/D	N/D	73	мембраны
вегетативные	белок GspE	Rv2868c	8,7	139	75%	N/D	N/D	109	цитоплазма

вегетативные	Фактор рециклинга рибосом Frr (фактор высвобождения рибосом) (RRF)	Rv2882c	100	116	57%	N/D	N/D	7	цитоплазма
вегетативные	Вероятная уридилаткиназа PyrH	Rv2883c	3,1	202	93%	N/D	N/D	108	цитоплазма
вегетативные	Фактор элонгации Tsf (EF-ts)	Rv2889c	19,4	586	91%	50	69	72	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Фактор элонгации Tsf (EF-ts)	Rv2889c	71,7	174	58%	38	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Фактор элонгации Tsf (EF-ts)	Rv2889c	5,6	337	75%	50	69	72	цитоплазма
вегетативные	30S рибосомный белок S2 RpsB	Rv2890c	15,6	186	75%	N/D	N/D	89	цитоплазма
вегетативные	30S рибосомный белок S2 RpsB	Rv2890c	72,3	231	92%	85	34	15	мембраны
покоящиеся (П1)	30S рибосомный белок S2 RpsB	Rv2890c	6,2	55	31%	85	34	15	мембраны
покоящиеся (П2)	30S рибосомный белок S2 RpsB	Rv2890c	31,3	160	85%	85	34	15	мембраны
вегетативные	Возможный белок утилизации микобактерии ViuB	Rv2895c	37,8	284	90%	N/D	N/D	36	цитоплазма
вегетативные	белок SRP	Rv2916c	4,2	214	62%	N/D	N/D	82	мембраны
вегетативные	белок деления клетки FtsY (рецептор SRP)	Rv2921c	2,3	228	68%	N/D	N/D	97	мембраны
вегетативные	Вероятная рибонуклеаза III Rnc (РНКаза III)	Rv2925c	11,9	111	86%	N/D	N/D	96	цитоплазма
вегетативные	АМФ-лигаза жирных кислот FadD28 (АМФ-синтетаза жирных кислот) (АМФ-синтаза жирных кислот)	Rv2941	5,1	479	79%	25	N/D	132	цитоплазма
покоящиеся (П1)	АМФ-лигаза жирных кислот FadD28 (АМФ-синтетаза жирных кислот) (АМФ-синтаза жирных кислот)	Rv2941	17,2	65	36%	25	N/D	132	цитоплазма
покоящиеся (П2)	АМФ-лигаза жирных кислот FadD28 (АМФ-синтетаза жирных кислот) (АМФ-синтаза жирных кислот)	Rv2941	9,8	74	33%	N/D	60	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная поликетидсинтаза Pks15	Rv2947c	12,5	53	46%	N/D	N/D	58	мембраны
вегетативные	гидроксibenzoил-AMP лигаза FadD22	Rv2948c	1,8	92	46%	N/D	N/D	103	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможная оксидоредуктаза	Rv2951c	45,8	119	65%	N/D	23	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная липаза / эстераза LioN	Rv2970c	138,4	94	75%	44	17	8	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятная липаза / эстераза LioN	Rv2970c	47,3	150	38%	44	17	8	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятная липаза / эстераза LioN	Rv2970c	58,6	93	40%	44	17	8	мембраны
вегетативные	Возможная оксидоредуктаза	Rv2971	7,3	262	79%	N/D	40	113	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможная оксидоредуктаза	Rv2971	29,7	98	76%	N/D	40	113	цитоплазма
вегетативные	Вероятная D-аланин - D-аланинлигаза DdlA (D-аланилаланинсинтетаза) (D-ala-D-ala лигаза)	Rv2981c	6,2	112	52%	91	N/D	73	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятная D-аланин - D-аланинлигаза DdlA (D-аланилаланинсинтетаза) (D-ala-D-ala лигаза)	Rv2981c	4,3	93	57%	91	N/D	73	мембраны
покоящиеся (П2)	ДНК-связывающий белок, гомолог HU, HupB (гистоноподобный белок) (HLP)	Rv2986c	123,8	100	69%	N/D	7	N/D	мембраны

покоящиеся (П2)	Глутамил-тРНК-синтетаза GltS (глутамат-тРНК-лигаза) (глутамил-тРНК-синтаза) (GLURS)	Rv2992c	6,5	58	23%	N/D	70	N/D	мембраны
вегетативные	Возможная 2-гидроксигепта-2,4-диен-1,7-диоат-изомеразы (HHDD-изомеразы)	Rv2993c	30,9	134	70%	N/D	26	45	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможная 2-гидроксигепта-2,4-диен-1,7-диоат-изомеразы (HHDD-изомеразы)	Rv2993c	56	74	43%	N/D	26	45	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможная 2-гидроксигепта-2,4-диен-1,7-диоат-изомеразы (HHDD-изомеразы)	Rv2993c	56	100	56%	N/D	26	45	цитоплазма
покоящиеся (П1)	3-изопропилмалатдегидрогеназа LeuB (бета-IPM дегидрогеназа) (IMDH) (3-IPM-DH)	Rv2995c	10,9	62	16%	77	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Вероятная D-3-фосфоглицератдегидрогеназа SerA1 (PGDH)	Rv2996c	2,5	345	89%	42	30	153	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная D-3-фосфоглицератдегидрогеназа SerA1 (PGDH)	Rv2996c	98,9	220	49%	27	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятная D-3-фосфоглицератдегидрогеназа SerA1 (PGDH)	Rv2996c	46,6	199	80%	42	30	153	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LppY	Rv2999	135,5	54	51%	N/D	N/D	9	мембраны
вегетативные	редуктоизомеразы IlvC (ацетогидроксикислотная изомероредуктаза) (альфа-кето-бета-гидроксилацилредуктоизомеразы)	Rv3001c	45,9	48	78%	5	49	24	мембраны
покоящиеся (П1)	редуктоизомеразы IlvC (ацетогидроксикислотная изомероредуктаза) (альфа-кето-бета-гидроксилацилредуктоизомеразы)	Rv3001c	419,4	90	29%	5	49	24	мембраны
покоящиеся (П2)	редуктоизомеразы IlvC (ацетогидроксикислотная изомероредуктаза) (альфа-кето-бета-гидроксилацилредуктоизомеразы)	Rv3001c	15	225	76%	5	49	24	мембраны
вегетативные	Ацетолактатсинтаза (большая субъединица) IlvB1 (синтаза ацетогидроксикислот)	Rv3003c	5,7	89	56%	N/D	N/D	75	мембраны
вегетативные	липопротеин LppZ	Rv3006	29,1	200	75%	N/D	N/D	33	мембраны
покоящиеся (П2)	липопротеин LppZ	Rv3006	147,3	76	62%	N/D	11	N/D	цитоплазма
вегетативные	Вероятная глутамил-тРНК (GLN) амидотрансфераза (субъединица B) GatB (субъединица B Glu-ADT)	Rv3009c	4,3	109	57%	N/D	N/D	80	мембраны
вегетативные	Вероятная глутамил-тРНК (GLN) амидотрансфераза (субъединица A) GatA (субъединица A Glu-ADT)	Rv3011c	2,6	252	67%	N/D	32	151	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная глутамил-тРНК (GLN) амидотрансфераза (субъединица A) GatA (субъединица A Glu-ADT)	Rv3011c	45,1	78	60%	N/D	32	151	цитоплазма
вегетативные	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (альфа-субъединица) FixB (альфа-ETF) (большая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFLS)	Rv3028c	55	227	80%	2	19	23	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (альфа-субъединица) FixB (альфа-ETF) (большая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFLS)	Rv3028c	70,5	232	80%	2	19	23	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (альфа-субъединица) FixB (альфа-ETF) (большая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFLS)	Rv3028c	32,8	300	47%	50	26	N/D	мембраны

покоящиеся (П2)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (альфа-субъединица) FixB (альфа-ETF) (большая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFLS)	Rv3028c	40,2	284	91%	50	26	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (альфа-субъединица) FixB (альфа-ETF) (большая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFLS)	Rv3028c	102,2	265	90%	2	19	23	цитоплазма
вегетативные	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (бета-субъединица) FixA (бета-ETF) (малая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFSS)	Rv3029c	68,8	419	85%	9	20	15	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (бета-субъединица) FixA (бета-ETF) (малая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFSS)	Rv3029c	39,2	142	64%	9	20	15	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятный флавопротеин с переносом электрона (бета-субъединица) FixA (бета-ETF) (малая субъединица флавопротеина с переносом электрона) (ETFSS)	Rv3029c	96,3	301	89%	9	20	15	цитоплазма
вегетативные	Секретируемый белок TB22.2	Rv3036c	11,5	90	60%	N/D	N/D	97	цитоплазма
вегетативные	FEIII-дицитрат-связывающий периплазматический липопротеин FecB	Rv3044	21,5	182	80%	N/D	N/D	42	мембраны
вегетативные	НАДФ-зависимая алкогольдегидрогеназа AdhC	Rv3045	6	374	81%	N/D	28	127	цитоплазма
покоящиеся (П2)	НАДФ-зависимая алкогольдегидрогеназа AdhC	Rv3045	50,9	289	76%	N/D	28	127	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv3075c	10,3	90	46%	35	11	58	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3075c	147,3	65	29%	35	11	58	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv3099c	19,1	47	33%	N/D	N/D	74	цитоплазма
вегетативные	фактор высвобождения пептидной цепи 2 PrfB (RF-2)	Rv3105c	6,3	191	79%	N/D	31	98	цитоплазма
покоящиеся (П2)	фактор высвобождения пептидной цепи 2 PrfB (RF-2)	Rv3105c	45,5	105	66%	N/D	31	98	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE24	Rv3139	2,8	69	36%	N/D	N/D	150	цитоплазма
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE23	Rv3140	22,9	123	72%	26	42	39	мембраны
покоящиеся (П1)	ацил-КоА дегидрогеназа FadE23	Rv3140	104,1	65	40%	26	42	39	мембраны
покоящиеся (П2)	ацил-КоА дегидрогеназа FadE23	Rv3140	20,2	193	51%	26	42	39	мембраны
вегетативные	NADH-дегидрогеназа I NuoC (NADH-убихинон-оксидоредуктаза, цепь C)	Rv3147	49,2	172	82%	N/D	N/D	27	цитоплазма
покоящиеся (П2)	NADH-дегидрогеназа I NuoE (NADH-убихинон-оксидоредуктаза, цепь E)	Rv3149	44,2	86	51%	N/D	33	N/D	цитоплазма
вегетативные	НАДН-дегидрогеназа I NuoI (НАДН-убихинон оксидоредуктаза, цепь I)	Rv3153	20,8	61	77%	N/D	N/D	67	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная диоксигеназа	Rv3161c	4,9	94	64%	49	47	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная диоксигеназа	Rv3161c	12,6	60	26%	74	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможная диоксигеназа	Rv3161c	21,7	154	53%	49	47	N/D	цитоплазма

покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv3169	5,5	39	29%	47	18	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3169	103,3	97	57%	47	18	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3205c	108,8	54	52%	N/D	9	N/D	мембраны
вегетативные	белок биосинтеза кофактора молибдена MoeB1 (МРТ-синтаза сульфурилаза) (молибдоптеринсинтаза сульфурилаза)	Rv3206c	22,9	72	41%	N/D	N/D	39	мембраны
вегетативные	Возможная фосfogлицератмутаза Gpm2 (фосfogлицеромутаза) (PGAM)	Rv3214	25,1	36	49%	N/D	59	55	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Возможная фосfogлицератмутаза Gpm2 (фосfogлицеромутаза) (PGAM)	Rv3214	9,9	77	12%	N/D	59	55	цитоплазма
вегетативные	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	64,4	175	61%	40	52	16	цитоплазма
вегетативные	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	38,7	56	48%	34	29	27	мембраны
покоящиеся (П1)	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	6,7	105	48%	40	52	16	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	45,1	46	64%	34	29	27	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	37,5	65	53%	34	29	27	мембраны
покоящиеся (П2)	Возможная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза, регулируемая железом	Rv3224	14,9	159	69%	40	52	16	цитоплазма
вегетативные	Вероятная субъединица препротейн-транслоказы SecA1	Rv3240c	2,5	635	67%	70	N/D	96	мембраны
покоящиеся (П1)	Вероятная субъединица препротейн-транслоказы SecA1	Rv3240c	15,9	133	19%	70	N/D	96	мембраны
вегетативные	Транскрипционный регулятор MtrA	Rv3246c	39,2	85	48%	N/D	N/D	35	цитоплазма
вегетативные	Транскрипционный регулятор MtrA	Rv3246c	64,3	314	87%	28	24	18	мембраны
покоящиеся (П1)	Транскрипционный регулятор MtrA	Rv3246c	97,6	128	64%	28	24	18	мембраны
покоящиеся (П2)	Транскрипционный регулятор MtrA	Rv3246c	43,3	175	83%	28	24	18	мембраны
покоящиеся (П1)	аденозилгомоцистеиназа SahH (S-аденозил-L-гомоцистеин гидролаза)	Rv3248c	6,3	106	42%	44	3	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	аденозилгомоцистеиназа SahH (S-аденозил-L-гомоцистеин гидролаза)	Rv3248c	560,7	292	72%	44	3	N/D	цитоплазма
вегетативные	маннозо-6-фосфат изомеразы ManA (фосфоманнозоизомеразы) (фосфоманноизомеразы) (PMI) (фосфогексоизомеразы) (фосфогексомутаза)	Rv3255c	7,1	68	41%	N/D	16	115	цитоплазма
покоящиеся (П2)	маннозо-6-фосфат изомеразы ManA (фосфоманнозоизомеразы) (фосфоманноизомеразы) (PMI) (фосфогексоизомеразы) (фосфогексомутаза)	Rv3255c	126,5	121	36%	N/D	16	115	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv3256c	7,5	79	48%	N/D	56	71	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3256c	10,8	78	59%	N/D	56	71	мембраны
вегетативные	D-альфа-D-маннозо-1-фосфатгуанилилтрансфераза ManB (D-альфа-D-гептоз-1-фосфатгуанилилтрансфераза)	Rv3264c	4	141	71%	N/D	N/D	104	цитоплазма

покоящиеся (П2)	D-альфа-D-маннозо-1-фосфатгуанилтрансфераза ManB (D-альфа-D-гептоз-1-фосфатгуанилтрансфераза)	Rv3264c	15	136	62%	N/D	49	N/D	мембраны
вегетативные	ацил-KoA дегидрогеназа FadE25	Rv3274c	19	499	89%	N/D	53	75	цитоплазма
покоящиеся (П2)	ацил-KoA дегидрогеназа FadE25	Rv3274c	14,7	189	71%	N/D	53	75	цитоплазма
вегетативные	бета-цепь 5 пропионил-CoA карбоксилазы AccD5 (pccase) (пропаноил-CoA: лигаза диоксида углерода)	Rv3280	4,7	330	82%	N/D	41	133	цитоплазма
покоящиеся (П1)	бета-цепь 5 пропионил-CoA карбоксилазы AccD5 (pccase) (пропаноил-CoA: лигаза диоксида углерода)	Rv3280	8,7	68	27%	81	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	бета-цепь 5 пропионил-CoA карбоксилазы AccD5 (pccase) (пропаноил-CoA: лигаза диоксида углерода)	Rv3280	29,1	133	73%	N/D	41	133	цитоплазма
покоящиеся (П2)	тиосульфат-серотрансфераза SseA (родана) (тиосульфат-цианид-транссульфураза) (тиосульфаттиотрансфераза)	Rv3283	51,7	242	82%	N/D	27	N/D	цитоплазма
вегетативные	бифункциональный белок ацетил- / пропионил-кофермент А карбоксилаза (альфа-цепь) AccA3	Rv3285	6,8	399	77%	88	N/D	120	цитоплазма
вегетативные	бифункциональный белок ацетил- / пропионил-кофермент А карбоксилаза (альфа-цепь) AccA3	Rv3285	4,1	340	75%	N/D	5	83	мембраны
покоящиеся (П2)	бифункциональный белок ацетил- / пропионил-кофермент А карбоксилаза (альфа-цепь) AccA3	Rv3285	80,3	127	32%	N/D	5	83	мембраны
покоящиеся (П1)	L-лизин-эпсилон-аминотрансфераза Lat (L-лизин-аминотрансфераза) (лизин-б-аминотрансфераза)	Rv3290c	5,3	121	62%	86	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv3292	4,7	150	76%	91	N/D	78	мембраны
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv3292	4,3	108	39%	91	N/D	78	мембраны
вегетативные	глицерин-3-фосфатдегидрогеназа GlpD2	Rv3302c	2,9	198	41%	N/D	N/D	91	мембраны
вегетативные	триптофанил-тРНК синтаза TrpS (триптофан-тРНК-лигаза) (TRPRS) (триптофан транслаза)	Rv3336c	5,8	208	69%	N/D	N/D	129	цитоплазма
вегетативные	Возможная метилтрансфераза (метилаза)	Rv3342	21,4	212	83%	N/D	N/D	64	цитоплазма
вегетативные	бифункциональный белок FolD: метилентетрагидрофолатдегидрогеназа + метенилтетрагидрофолатциклогидролаза	Rv3356c	27	268	94%	N/D	N/D	52	цитоплазма
покоящиеся (П2)	бифункциональный белок FolD: метилентетрагидрофолатдегидрогеназа + метенилтетрагидрофолатциклогидролаза	Rv3356c	12,9	42	50%	N/D	51	N/D	мембраны
вегетативные	Возможная оксидоредуктаза	Rv3368c	75,2	84	56%	N/D	N/D	10	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3369	2,8	109	54%	N/D	72	N/D	цитоплазма
вегетативные	3-гидроксиацилтиозфирдегидратаза HtdY	Rv3389c	55,1	294	82%	15	27	22	цитоплазма
покоящиеся (П1)	3-гидроксиацилтиозфирдегидратаза HtdY	Rv3389c	24,8	189	65%	15	27	22	цитоплазма
покоящиеся (П2)	3-гидроксиацилтиозфирдегидратаза HtdY	Rv3389c	34	281	88%	15	27	22	цитоплазма
вегетативные	липопротеин LpqD	Rv3390	105,9	258	51%	N/D	N/D	11	мембраны

вегетативные	гидролаза	Rv3400	45	308	90%	N/D	N/D	30	цитоплазма
покоящиеся (П2)	гидролаза	Rv3400	27,3	110	68%	N/D	38	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа GuaB3 (имп-дегидрогеназа) (дегидрогеназа инозиновой кислоты) (инозинатдегидрогеназа) (имп-оксидоредуктаза) (инозин-5'-монофосфат-оксидоредуктаза)	Rv3410c	6,5	54	45%	41	28	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа GuaB3 (имп-дегидрогеназа) (дегидрогеназа инозиновой кислоты) (инозинатдегидрогеназа) (имп-оксидоредуктаза) (инозин-5'-монофосфат-оксидоредуктаза)	Rv3410c	50,9	130	48%	41	28	N/D	цитоплазма
вегетативные	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа GuaB2 (имп-дегидрогеназа) (дегидрогеназа инозиновой кислоты) (инозинатдегидрогеназа)	Rv3411c	4,4	415	83%	N/D	N/D	137	цитоплазма
вегетативные	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа GuaB2 (имп-дегидрогеназа) (дегидрогеназа инозиновой кислоты) (инозинатдегидрогеназа)	Rv3411c	14,1	461	81%	N/D	N/D	56	мембраны
вегетативные	60 кДа шаперонин 1 GroEL1 (белок CPN60-1) (белок GroEL 1)	Rv3417c	6,5	528	90%	45	30	122	цитоплазма
вегетативные	60 кДа шаперонин 1 GroEL1 (белок CPN60-1) (белок GroEL 1)	Rv3417c	18,3	410	86%	N/D	6	48	мембраны
покоящиеся (П2)	60 кДа шаперонин 1 GroEL1 (белок CPN60-1) (белок GroEL 1)	Rv3417c	17,2	334	84%	N/D	6	48	мембраны
покоящиеся (П2)	60 кДа шаперонин 1 GroEL1 (белок CPN60-1) (белок GroEL 1)	Rv3417c	46,6	58	42%	45	30	122	цитоплазма
покоящиеся (П2)	10 кДа шаперонин GroES (белок CPN10) (белок GroES) (BCG-белок теплового шока) (антиген 10 кДа)	Rv3418c	470,8	334	99%	N/D	4	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Аланин рацемаза Alr	Rv3423c	47,3	96	21%	44	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	глутаматдекарбоксилаза GadB	Rv3432c	12,4	77	30%	N/D	52	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	глюкозамин - фруктозо-6-фосфатаминотрансфераза [изомеризация] GlmS (гексозофосфатаминотрансфераза) (D-фруктозо-6-фосфатамидотрансфераза) (GFAT) (L-глутамин-D-фруктозо-6-фосфатамидотрансфераза) (глюкозамин-6-фосфат-амидотрансфераза) фосфатсинтаза)	Rv3436c	83,4	107	46%	32	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	ДНК-направленная РНК-полимераза (альфа-цепь) RpoA (альфа-цепь транскриптазы) (альфа-субъединица РНК-полимеразы) (ДНК-направленная РНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv3457c	15	557	93%	28	43	91	цитоплазма
вегетативные	ДНК-направленная РНК-полимераза (альфа-цепь) RpoA (альфа-цепь транскриптазы) (альфа-субъединица РНК-полимеразы) (ДНК-направленная РНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv3457c	3,6	179	89%	73	N/D	87	мембраны
покоящиеся (П1)	ДНК-направленная РНК-полимераза (альфа-цепь) RpoA (альфа-цепь транскриптазы) (альфа-субъединица РНК-полимеразы) (ДНК-направленная РНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv3457c	14,7	255	87%	28	43	91	цитоплазма
покоящиеся (П1)	ДНК-направленная РНК-полимераза (альфа-цепь) RpoA (альфа-цепь транскриптазы) (альфа-субъединица РНК-полимеразы) (ДНК-направленная РНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv3457c	13,3	260	62%	73	N/D	87	мембраны
покоящиеся (П2)	ДНК-направленная РНК-полимераза (альфа-цепь) RpoA (альфа-цепь транскриптазы) (альфа-субъединица РНК-полимеразы) (ДНК-направленная РНК-нуклеотидилтрансфераза)	Rv3457c	23,9	70	75%	28	43	91	цитоплазма
покоящиеся (П1)	белок PPE60 семейства PE	Rv3478	13,7	161	17%	72	N/D	N/D	мембраны

вегетативные	триацилглицеринсинтаза (диацилглицерин ацилтрансфераза)	Rv3480c	12,5	112	56%	N/D	N/D	47	мембраны
вегетативные	Вероятная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv3485c	27	68	53%	N/D	N/D	52	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Вероятная короткоцепочечная дегидрогеназа / редуктаза	Rv3485c	62,6	54	45%	N/D	14	N/D	мембраны
покоящиеся (П1)	Белок Mse4C семейства Mse	Rv3497c	13,7	100	9%	72	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	ацил-КоА дегидрогеназа FadE27	Rv3505	6,8	62	38%	N/D	N/D	119	цитоплазма
вегетативные	синтаза ацетогидроксикислот IlvX (ацетолактатсинтаза)	Rv3509c	16,7	206	60%	48	8	83	цитоплазма
покоящиеся (П1)	синтаза ацетогидроксикислот IlvX (ацетолактатсинтаза)	Rv3509c	4,9	224	72%	48	8	83	цитоплазма
покоящиеся (П1)	синтаза ацетогидроксикислот IlvX (ацетолактатсинтаза)	Rv3509c	125,6	77	21%	21	61	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	синтаза ацетогидроксикислот IlvX (ацетолактатсинтаза)	Rv3509c	9,6	75	45%	21	61	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	синтаза ацетогидроксикислот IlvX (ацетолактатсинтаза))	Rv3509c	217,6	254	75%	48	8	83	цитоплазма
вегетативные	КоА-трансфераза (бета-субъединица)	Rv3552	20,8	62	61%	N/D	N/D	67	цитоплазма
покоящиеся (П2)	ацетил-КоА-ацетилтрансфераза FadA6 (ацетоацетил-КоА-тиолаза)	Rv3556c	21,7	62	59%	N/D	47	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	оксидоредуктаза.	Rv3570c	8,5	44	26%	82	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	оксидоредуктаза	Rv3570c	12,3	52	43%	N/D	55	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv3586	83,9	110	42%	31	44	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Консервативный белок	Rv3586	18,2	87	54%	31	44	N/D	мембраны
вегетативные	АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица ClpC1	Rv3596c	9	471	62%	N/D	N/D	106	цитоплазма
вегетативные	АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица ClpC1	Rv3596c	15,7	414	62%	92	62	55	мембраны
покоящиеся (П1)	АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица ClpC1	Rv3596c	2,6	175	14%	92	62	55	мембраны
покоящиеся (П2)	АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица ClpC1	Rv3596c	9,5	458	55%	92	62	55	мембраны
покоящиеся (П1)	Лизил-тРНК синтетаза 1 LysS (лизин-тРНК-лигаза 1) (LysRS 1) (лизин-транслаза)	Rv3598c	8,7	113	15%	81	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Связанный с секрецией ESX-1 белок EspD	Rv3614c	22,9	246	94%	N/D	N/D	62	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Липопротеин LpqG	Rv3623	22,2	335	66%	65	12	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Липопротеин LpqG	Rv3623	93,6	163	70%	65	12	N/D	мембраны
вегетативные	Неорганическая пирофосфатаза Ppa (пирофосфатфосфогидролаза) (PPASE) (неорганическая дифосфатаза) (дифосфатфосфогидролаза)	Rv3628	32,5	139	57%	N/D	34	41	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Неорганическая пирофосфатаза Ppa (пирофосфатфосфогидролаза) (PPASE) (неорганическая дифосфатаза) (дифосфатфосфогидролаза)	Rv3628	39,3	142	59%	N/D	34	41	цитоплазма

покоящиеся (П1)	UDP-глюкозо-4-эпимераза GalE1 (галактовальденаза) (UDP-галактоз-4-эпимераза) (уридиндифосфат-галактозо-4-эпимераза) (уридиндифосфогалактоз 4-эпимераза)	Rv3634c	44,8	68	39%	6	N/D	34	цитоплазма
вегетативные	Вероятный переносчик анионов АТФаза	Rv3679	17,6	150	55%	N/D	N/D	50	мембраны
покоящиеся (П1)	лиаза	Rv3684	11,1	74	38%	76	N/D	N/D	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv3688c	50,8	61	82%	N/D	N/D	25	цитоплазма
вегетативные	Вероятный регуляторный белок транскрипции MoxR2 метанолдегидрогеназы	Rv3692	4,7	51	76%	N/D	N/D	78	мембраны
покоящиеся (П1)	глицеринкиназа GlpK (АТФ: глицерин-3-фосфотрансфераза) (глицерокиназа)	Rv3696c	6,3	79	52%	44	N/D	72	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv3699	14,8	291	94%	24	N/D	92	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Консервативный белок	Rv3699	17,5	193	90%	24	N/D	92	цитоплазма
вегетативные	Глутамат-цистеинлигаза GshA (гамма-глутамилцистеин синтетаза) (гамма-ECS) (GCS) (гамма-глутамил-L-цистеин синтетаза)	Rv3704c	4,1	103	34%	N/D	N/D	84	мембраны
вегетативные	Аспартат-полуальдегиддегидрогеназа Asd (ASA-дегидрогеназа) (ASADH) (аспарагиновая полуальдегиддегидрогеназа) (L-аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназа)	Rv3708c	22,2	264	85%	N/D	N/D	63	цитоплазма
вегетативные	Аспартат-полуальдегиддегидрогеназа Asd (ASA-дегидрогеназа) (ASADH) (аспарагиновая полуальдегиддегидрогеназа) (L-аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназа)	Rv3708c	7,5	295	82%	43	56	71	мембраны
покоящиеся (П1)	Аспартат-полуальдегиддегидрогеназа Asd (ASA-дегидрогеназа) (ASADH) (аспарагиновая полуальдегиддегидрогеназа) (L-аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназа)	Rv3708c	49,7	226	26%	43	56	71	мембраны
покоящиеся (П2)	Аспартат-полуальдегиддегидрогеназа Asd (ASA-дегидрогеназа) (ASADH) (аспарагиновая полуальдегиддегидрогеназа) (L-аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназа)	Rv3708c	10,8	255	84%	43	56	71	мембраны
вегетативные	2-изопропилмалатсинтаза LeuA (альфа-изопропилмалатсинтаза) (альфа-IPM синтетаза)	Rv3710	4,7	108	41%	N/D	N/D	134	цитоплазма
вегетативные	Возможная синтаза жирных кислот	Rv3720	19,2	102	55%	N/D	N/D	47	мембраны
вегетативные	Предполагаемая триацилглицеринсинтаза (диацилглицерин ацилтрансфераза) Tgs2	Rv3734c	32,1	371	80%	N/D	N/D	43	цитоплазма
вегетативные	Предполагаемая триацилглицеринсинтаза (диацилглицерин ацилтрансфераза) Tgs2	Rv3734c	180,7	391	76%	N/D	43	6	мембраны
покоящиеся (П2)	Предполагаемая триацилглицеринсинтаза (диацилглицерин ацилтрансфераза) Tgs2	Rv3734c	19,3	174	55%	N/D	43	6	мембраны
вегетативные	Префенатдегидрогеназа TgrA (PDH) (гидроксифенилпируватсинтаза)	Rv3754	70,5	93	43%	N/D	N/D	16	мембраны
вегетативные	Консервативный белок	Rv3755c	50,8	80	78%	28	N/D	25	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок	Rv3755c	11,9	109	76%	28	N/D	25	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Возможный осмопротектор (глицин бетаин / карнитин / холин / L-пролин) связывающий липопротеин ProX	Rv3759c	24,8	73	37%	15	N/D	N/D	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Предшественник липопротеинового антигена 19 кДа LpqH	Rv3763	14,7	219	37%	N/D	54	N/D	цитоплазма

вегетативные	Возможная S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv3767c	23,7	72	69%	N/D	N/D	58	цитоплазма
вегетативные	Возможная S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv3767c	20,4	114	68%	37	N/D	43	мембраны
покоящиеся (П1)	Возможная S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза	Rv3767c	72,1	285	87%	37	N/D	43	мембраны
вегетативные	Возможная еноил-КоА гидратаза EchA21 (еноилгидраза) (ненасыщенная ацил-КоА гидратаза) (кротоназа)	Rv3774	23,7	178	83%	N/D	N/D	58	цитоплазма
вегетативные	Предполагаемая оксидоредуктаза	Rv3777	18,4	110	59%	N/D	N/D	79	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Предполагаемая оксидоредуктаза	Rv3778c	6,2	68	31%	85	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	ABC-переносчик RfbE	Rv3781	108,8	43	33%	N/D	9	N/D	мембраны
вегетативные	АМФ-лигаза жирных кислот FadD32 (АМФ-синтетаза жирных кислот) (АМФ-синтаза жирных кислот)	Rv3801c	3,9	468	79%	N/D	N/D	142	цитоплазма
вегетативные	АМФ-лигаза жирных кислот FadD32 (АМФ-синтетаза жирных кислот) (АМФ-синтаза жирных кислот).	Rv3801c	19,9	363	70%	N/D	N/D	46	мембраны
вегетативные	Вероятный консервативный мембранный белок	Rv3802c	25,8	49	36%	N/D	N/D	37	мембраны
вегетативные	Секретируемый антигенный белок MPT51 / MPB51 FbpD (MPT51 / MPB51 антиген 85 комплекс C) (AG58C) (микоилитрансфераза 85C) (фибронектин-связывающий белок C) (85C)	Rv3803c	25,1	109	79%	3	N/D	55	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Секретируемый антигенный белок MPT51 / MPB51 FbpD (MPT51 / MPB51 антиген 85 комплекс C) (AG58C) (микоилитрансфераза 85C) (фибронектин-связывающий белок C) (85C)	Rv3803c	47,6	154	79%	3	N/D	55	цитоплазма
вегетативные	Секретируемый антиген 85-а FbpA (микоилитрансфераза 85A) (фибронектин-связывающий белок A) (комплекс антигена 85 A)	Rv3804c	42,4	218	71%	N/D	N/D	32	цитоплазма
вегетативные	жирнокислотная-АМР-лигаза FadD23 (жирнокислотная-АМР-синтетаза) (жирная-кислотная-АМР-синтаза)	Rv3826	6,8	83	37%	N/D	N/D	120	цитоплазма
покоящиеся (П2)	серил-тРНК синтетаза SerS (серин-тРНК-лигаза) (SERRS) (серин-транслаза)	Rv3834c	80,3	72	33%	N/D	13	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Бактериоферритин BfrB	Rv3841	39,3	82	44%	N/D	34	N/D	цитоплазма
вегетативные	Супероксиддисмутаза [FE] SodA	Rv3846	37,3	281	99%	11	50	38	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Супероксиддисмутаза [FE] SodA	Rv3846	35,8	138	65%	11	50	38	цитоплазма
покоящиеся (П2)	Супероксиддисмутаза [FE] SodA	Rv3846	17,2	77	60%	11	50	38	цитоплазма
вегетативные	Связанный с секрецией ESX-1 белок EspG1	Rv3866	20,4	42	37%	N/D	N/D	43	мембраны
вегетативные	Связанный с секрецией ESX-1 белок EspG1	Rv3867	59,2	165	63%	N/D	N/D	19	цитоплазма
вегетативные	Консервативный компонент ESX EccCb1. Белок системы секреции типа VII ESX-1.	Rv3871	4,9	366	70%	N/D	N/D	77	мембраны
вегетативные	Секретируемый субстратный белок В ESX-1, EspB. Консервированный белок, богатый аланином и глицином	Rv3881c	3,6	452	89%	N/D	N/D	145	цитоплазма
вегетативные	Вероятная тиоредоксинредуктаза TrxB2 (TRXR) (TR)	Rv3913	17,9	226	88%	N/D	N/D	81	цитоплазма
покоящиеся (П1)	Вероятная тиоредоксинредуктаза TrxB2 (TRXR) (TR)	Rv3913	45,1	73	54%	45	N/D	N/D	мембраны
покоящиеся (П2)	Тиоредоксин TrxC (TRX) (MPT46)	Rv3914	10	90	67%	N/D	58	N/D	цитоплазма
вегетативные	Консервативный белок, похожий на белок jag	Rv3920c	8,9	320	93%	N/D	N/D	107	цитоплазма

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту – доктору биологических наук, профессору Арсению Сумбатовичу Капрельянцу за постоянную помощь и поддержку, неоценимую помощь в моем научном становлении, проработке исследовательских планов и написании статей и диссертационной работы на всех этапах выполнения.

Искренне благодарю коллектив отдела медицинской микробиологии за научное обсуждение полученных результатов и плодотворное сотрудничество. Отдельную благодарность автор выражает научным сотрудникам лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов - Деминой Галине Рудольфовне, Никитушкину Вадиму Дмитриевичу и Вострокнутовой Галине Николаевне за постоянную поддержку, ценные советы, помощь и участие в ходе выполнения работы.

Автор выражает глубокую благодарность и искреннюю признательность за плодотворную совместную работу в области антибактериальной фотодинамики, ценные советы, анализ и обсуждение полученных результатов доктору химических наук, профессору Александру Павловичу Савицкому.

Благодарю сотрудников Института туберкулеза - доктора биологических наук, профессора А.С. Апта, доктора биологических наук Т.К. Кондратьеву и к.б.н. Ирину Линге за интерес к моей работе, плодотворное сотрудничество и интересные научные дискуссии.

Благодарю доктора биологических наук, профессора Г.И. Эль-Регистан, доктора биологических наук А.Л. Мулюкина, доктора химических наук Л.М. Тимофееву и доктора биологических наук К. Шумаева за внимание к моей работе и важные рекомендации.

Благодарю мою семью, друзей и коллег за огромную поддержку, внимание и терпение.