

## БИОХИМИЯ РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

© 2025 г. М. О. ШЛЕЕВА, Г. Р. ДЕМИНА, А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Условия реактивация покоящихся форм микобактерий. III. Роль секретируемых факторов в реактивации покоящихся микобактерий. IV. Факторы реактивации липидной природы. V. Вовлечение цАМФ в реактивацию покоящихся микобактерий. VI. Роль трегалозы/трегалазы в реактивации покоящихся микобактерий. VII. Роль превращений свободных порфиринов в реактивации. VIII. Омики процесса реактивации (транскриптом, протеом, метаболом). IX. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Патогенные медленно растущие микобактерии, такие, как *Mycobacterium leprae* или *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) способны выживать длительное время в организме хозяина после начального заражения, в том числе за счет перехода в покоящееся нерепликативное состояние, являющееся адаптивным механизмом выживания у неспорообразующих бактерий [1]. Покоящиеся формы *Mtb* могут находиться в течение многих лет в организме хозяина, что приводит к развитию латентного туберкулеза (ТБ) у 25% людей Земли. В 5–10% случаев происходит реактивация покоящихся микобактерий (ПМ), приводящая к их активному делению (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>), что вызывает рецидив заболевания [2, 3], и это составляет миллионы случаев в год в масштабах планеты. Процесс реактивации заболевания зависит от индивидуальных особенностей иммунной системы носителя и от пока недостаточно изученных взаимодействий патоген-хозяин.

---

*Список сокращений:* ангидроГМДП – N-ацетилглюкозаминил-β(1→4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат; АЦ – аденилатциклаза; НК – «некультивируемость»; НФТ – нитрофенилтиоцианаты; ПГ – пептидогликан; ПМ – покоящиеся микобактерии; СНЖК – свободные ненасыщенные жирные кислоты; ТАГ – триацилглицеролы; ТБ – туберкулез; ТМК – тетраметилловый эфир копропорфирина; ФПГ – фрагменты пептидогликана; цАМФ-ТФ – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор; *Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*; *Msm* – *Mycobacterium smegmatis*; РЕ/РРЕ – пролин-глутаминовая кислота /пролин-пролин-глутаминовая кислота; Rpf – resuscitation promoting factor; RipA – resuscitation promoting factor interacting protein A; VM-A – валидамицин А.

*Адрес для корреспонденции:* margoshleeva@gmail.com

Особую актуальность явление реактивации ПМ приобрело в настоящее время в связи с распространением коронавирусной инфекции. В последние годы было продемонстрировано, что заражение COVID-19 нередко приводит к переходу латентного туберкулеза в активную форму, которая в значительном проценте случаев оказывается лекарственно-устойчивой [4].

Несмотря на то, что явление активации латентного ТБ известно уже много лет, механизм этого процесса до сих пор фрагментарен и до конца неясен. Тем не менее, благодаря интенсивным исследованиям на моделях *in vitro*, имитирующих латентное состояние [5], получен ряд важных результатов, проясняющих механизм реактивации ПМ, а также найдены факторы, приводящие к запуску этого процесса.

В настоящем обзоре представлены современные знания, касающиеся биохимических механизмов реактивации покоящихся микобактерий, что важно как для фундаментальной, так и для медицинской микробиологии.

## II. УСЛОВИЯ РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ

Процесс перехода ПМ в активное состояние является многостадийным. 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 [6]. 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) [7]. Избыток питательных компонентов в среде тоже может оказаться критичным фактором для успешной реактивации, поскольку такой избыток может оказаться токсичным. Механизм этого явления, названного «смерть, ускоряемая субстратом», связывают с накоплением токсичных интермедиатов в путях метаболизма данного субстрата [8]. Так, было продемонстрировано, что для реактивации покоящихся форм *Micrococcus luteus* нельзя использовать мясо-пептонный бульон, являющийся обогащенной субстратами средой [9]. Чаще всего восстановление стрессированных бактерий проводят на достаточно обедненных средах с низким содержанием источника углерода (например, глицерина).

Часто реактивация бывает успешной на жидких средах, но в тоже время полностью отсутствует на плотных агаризированных средах [10, 11]. Это явление получило название «некультивируемость» (НК), употребляемое в операционном смысле [12]. «Некультивируемость», как полагают, может быть вызвана несколькими причинами: накопление секретируемых токсических веществ в больших локальных концентрациях вследствие несбалансированности метаболизма; значительная величина поверхностного натяжения на границе раздела обводненный слой агара/воздух; другие неоптимальные физические условия. Тем не менее, истинные причины и процессы, приводящие к НК состоянию, остаются не установленными. В процессе реактивации на жидких средах НК состояние постепенно исчезает, а в конце реактивации клетки становятся полностью культивируемые на любых средах [11, 12].

### III. РОЛЬ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ФАКТОРОВ В РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Успешную реактивацию ПМ в жидкой среде часто связывают с накоплением неких химических факторов в окружающей среде. Так, было обнаружено, что реактивации клеток старой культуры *Mtb* из НК состояния благоприятствует добавление к среде супернатанта, полученного из культуры *Mtb* ранней стационарной фазы. В этом супернатанте были выявлены фосфолипиды и некие пептиды, как предполагают, репарирующие повреждения биологических мембран и ускоряющие рост бактерий [13].

Филогенетически связанная с микобактериями неспорообразующая бактерия *M. luteus* способна переходить в покоящееся и НК состояние в результате длительного пребывания в стационарной фазе. Однако, при добавлении к среде реактивации супернатанта, полученного из активно растущих культур *M. luteus* происходила индукция размножения таких форм [14]. В таком активирующем супернатанте был обнаружен белок, способствующий ускоренной реактивации покоящихся клеток *M. luteus* – Rpf (Resuscitation promoting factor) [9]. В микобактериях имеются гомологи этого белка, пять у *Mtb* [15] и четыре у непатогенной бактерии *Mycobacterium* (basonym: *Mycobacterium*) *smegmatis* (*Msm*), являющейся широко используемым модельным организмом для изучения биохимии микобактерий [16]. Делеция гена, кодирующая белок Rpf из *M. luteus* приводила к аттенюированию роста этой бактерии. В отличие от микрококка, удаление единичного белка Rpf не влияет на скорость роста *Mtb in vitro*, однако удаление трех или более белков Rpf приводит к значительному замедлению роста *Mtb* [17]. Было продемонстрировано, что рекомбинантный RpfВ из микобактерий способен промотировать рост лиофилизированных микобактериальных клеток [18], а также увеличивать количество детектируемых клеток *Mtb* в образцах мокроты больных активным ТБ людей [19].

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 размножению в органах мышей *in vivo* [17]. Было обнаружено, что штамм *Mtb* с делецией гена, кодирующего RpfВ отличался дефектным ростом в процессе реактивации хронической формы ТБ у мышей [20]. 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 мышцах [21]. Такая двойная делеция способствовала дефектному росту *Mtb* в макрофагах мышей, но положительно регулировала синтез цитокинов воспалительного сигналинга [21]. С другой стороны, путем комбинирования различных вариантов делеций генов *rpf* в клетках *Mtb* было обнаружено, что для реактивации наиболее значимы RpfВ и RpfЕ [17].

RpfВ, RpfС и RpfЕ продемонстрировали максимальную индукцию во время реактивации, причем, *rpfB* и *rpfC* экспрессируются в первые часы реактивации нерепликативных клеток *Mtb*, образованных в гипоксических условиях [22]. Уровень экспрессии остальных генов *rpf* достигал максимума позже. Изучение реактивации НК форм *Mtb*, полученных в условиях культивирования с ограничением содержания ионов калия, выявило, что большинство генов, кодирующих Rpf, активировались только после начала клеточного деления. Только *rpfE* повышался на 7-й день, совпадающий с началом размножения. Уровень RpfВ был повышен после 8 дней реактивации [23].

Эти эксперименты, несомненно, указывают на значение белков Rpf в реактивации ПМ.

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ Rpf

Согласно первоначальной гипотезе, Rpf рассматривался как бактериальный цитокин, который связывается с внеклеточным рецептором, что приводит к стимуляции роста [9]. Однако попытки найти соответствующий рецептор не были успешными. В тоже время, структурные исследования продемонстрировали четкую гомологию Rpf с лизоцимом и литическими трансгликозилазами [24]. Кристаллическая структура домена, консервативного для белков семейства Rpf, выявила лизоцимоподобную складку с-типа [25]. На этом основании было предсказано, что в результате ферментативной активности этого белка будет расщепляться гликозидная связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетил(гликолил)мурамовой кислотой в пептидогликане клеточной стенки [24]. Муралитическая активность белков Rpf была экспериментально подтверждена путем демонстрации способности Rpf расщеплять субстраты, подобные клеточной стенке *M. luteus* [26]. Интересно, что роль гидролаз клеточной стенки была ранее установлена при изучении процесса прорастания спор у рода *Bacillus*. Так, штамм *B. anthracis* с делецией нескольких гидролаз пептидогликана способен образовывать споры, но процесс их прорастания дефектен [27, 28]. Подобный эффект наблюдался в мутантных штаммах *Streptomyces coelicolor* с делецией генов пептидогликангидролаз [29], где также был продемонстрирован дефектный процесс прорастания спор в отсутствие этих ферментов. Одним из возможных механизмов реактивирующего действия Rpf является непосредственное участие Rpf в заключительном этапе деления клетки, приводящем к разъединению соседних клеток при помощи ограниченного гидролиза пептидогликана (ПГ). В пользу этого предположения говорит факт дезагрегации клеточных агрегатов при добавлении Rpf к культурам *Msm* и *M. luteus* [30]. 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. Таким образом, было предположено, что факторы реактивации, входящие в состав семейства Rpf (*rpfA*, *rpfB*, *rpfC*, *rpfD*, *rpfE*) стимулируют рост и реактивацию микобактерий за счет их способности к ремоделингу клеточной стенки.

Другое предположение относительно участия Rpf в реактивации состоит в том, что Rpf действует косвенно, гидролизуя ПГ бактериальных клеток и высвобождая активные продукты гидролиза [30].

Было показано, что Rpf способен гидролизовать клеточную стенку микобактерий [31]. Наблюдаемое расщепление ПГ было специфическим, поскольку в присутствии эффективных ингибиторов Rpf 1,5-динитро-2,4-бистиоцианатобензола и 3-нитро-4-тиоцианатофенил-фенилметанола подобный эффект не наблюдался. Фрагменты клеточной стенки *Msm*, выделившиеся после расщепления в присутствии Rpf, использовали в экспериментах по реактивации НК микобактерий [32]. Такие клетки способны к реактивации в жидкой среде в присутствии экзогенно добавленного рекомбинантного белка Rpf [32]. Продукты гидролиза клеточной стенки – фрагменты пептидогликана (ФПГ), внесенные в жидкую среду, также стимулировали реактивацию этих форм микобактерий. При этом концентрация ФПГ была критичной для успешности реактивации [31]. 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 Rpf [31]. Эта стимуляция была специфичной для ФПГ, так как микро-

бактериальный арабиногалактан не стимулировал реактивацию. Аналогичные эффекты ФПГ наблюдались при реактивации покоящихся форм *Mtb*, хотя оптимальная концентрация фрагментов составляла около 0,2 мкг/мл. ФПГ не только стимулировали процесс реактивации, но также демонстрировали способность стимулировать скорость роста стрессированных клеток *Mtb* [31].

Эти и другие эксперименты стали основой для предположения, что активные продукты энзиматического действия гидролиза ПГ под действием Rpf служат триггером для последовательности событий, в конечном итоге приводящих к реактивации. Эта идея была сформулирована в ряде публикаций [33–38].

В этой связи интересными представляются эксперименты, в которых было обнаружено, что ФПГ (муропептиды) могут стимулировать прорастание спор *B. subtilis* [34, 35]. Муропептиды предположительно способны взаимодействовать с PASTA-доменами серин/треонин протеинкиназы PrkC [34]. Известно, что при прорастании спор активируется PrkC, вследствие этого происходит фосфорилирование рибосомных ГТФаз (EF-G), необходимых для запуска процессов трансляции белка в прорастающих спорах. В микобактериях имеется серин/треонин протеин киназа PknB, являющаяся гомологом PrkC и также содержащая внеклеточные PASTA-домены [37]. Благодаря активности PknB происходит фосфорилирование белка Wag31 (гомолога DivIVA), участвующего в морфогенезе во время фазы активного роста бактерий [39].

В исследовании Мира с соавторами [40] несколько химически синтезированных муропептидов были изучены на предмет их стимулирующей реактивацию активности в отношении покоящихся культур *Mtb*. Это исследование продемонстрировало слабый реактивационный эффект для двух типов муропептидов. В тоже время химически синтезированные муропептиды оказывали выраженный стимулирующий эффект на прорастание спор *B. subtilis* [41]. Необходимо отметить, что в работе Мира с соавторами были использованы моносахарид-олигопептиды [40], тогда как в работе [41] было обнаружено, что минимальным структурным мотивом, необходимым для реактивации спор *B. subtilis*, являются дисахаридные фрагменты ПГ.

#### СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗ RpfB И RipA

Было установлено, что пептидогликангидролазная активность белка RpfB осуществляется в комплексе с другим внеклеточным ферментом, стимулирующим реактивацию – RipA (resuscitation promoting factor interacting protein A). RipA является белком, состоящим из 472 остатков, кодируемым геном *Mtb rv1477*. RipA связывается с белками RpfB и Rpf E [42–45]. Делеция RipA-ортолога у *Msm* привела к дефектам при образовании септы во время клеточного деления [44]. Обнаружено, что оба белка (RpfB и RipA) со-локализуются в перегородке делящихся клеток [44, 45]. RpfB расщепляет гликозидные связи в ПГ клеточной стенки [24], тогда как, RipA является L,D-эндопептидазой – протеолитическим ферментом, способным расщеплять пептидные связи внутри пептидной цепи (гидролизует цепь между D-глутаматом и мезо-диаминопимелиновой кислотой, что приводит к нарушению поперечных сшивок пептидогликана, определяющих ригидность и стабильность ПГ [44, 46] (Рис. 1). Взаимодействие между этими гидролазами клеточной стенки приводит к синергетическому гидролизу микобактериального ПГ [46].

В результате гидролиза ПГ при совместном действии белков RpfB и RipA наблюдалась максимально высокая эффективность гидролиза ПГ по сравнению с действием отдельных белков [46].

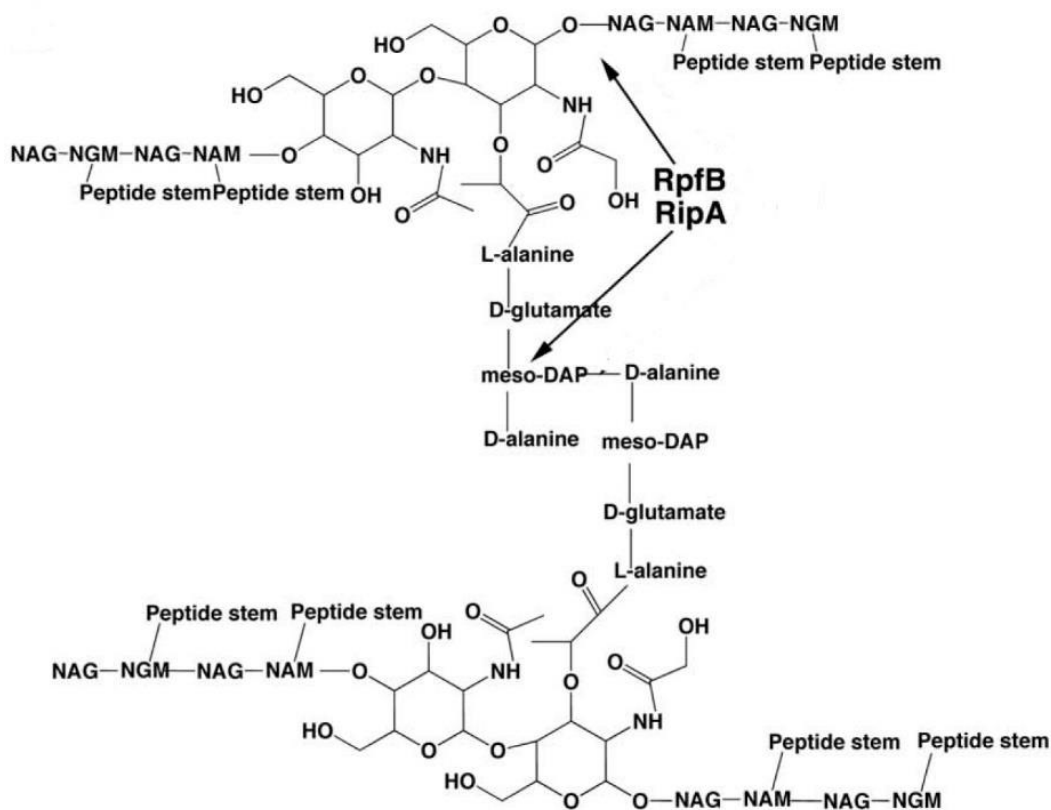


Рис. 1. Гидролиз пептидогликана под действием RpfB и RipA [44].

NAG – N-ацетилглюкозамин; NAM – N-ацетилмуравовая кислота; NGM – N-гликолилмуравовая кислота; meso-DAP – мезо-диаминопимелиновая кислота.

Было проведено исследование влияния совместного действия белков RpfB и RipA на реактивацию покоящихся НК микобактерий. Добавление либо отдельного белка (RpfB или RipA), либо их смеси в среду роста значительно стимулировало реактивацию и рост изначально покоящихся бактерий. Более того, первоначально наблюдаемая синергия в экспериментах по деградации ПГ также наблюдалась и в случае реактивации [46].

Анализ химической природы продуктов, образующихся в результате гидролиза ПГ в присутствии ферментов RpfB и RipA, прояснил молекулярный механизм этой реакции. Был определен продукт совместного действия RpfB и RipA – N-ацетилглюкозаминил-β(1→4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат (ангидроГМДП) (Рис. 2), который является аналогичным продукту литического действия трансгликозилазы [47]. Этот муропептид, полученный в результате химического синтеза, был способен стимулировать реактивацию НК бактериальных клеток, аналогично RpfB или RipA [46].

Следует отметить, что применение ряда других муропептидов или их фрагментов, включая моносахарид-дипептид (MurNAc–L-Ala–D-isoGlu), дипептид (L-Ala–D-Glu), аминокислоты (Ala, Glu(n)), моносахарид GlcNAc, дисахарид (Glc–NAc–MurNAc), в таком же концентрационном диапазоне, как для ангидроГМДП, не приводило к какому-либо

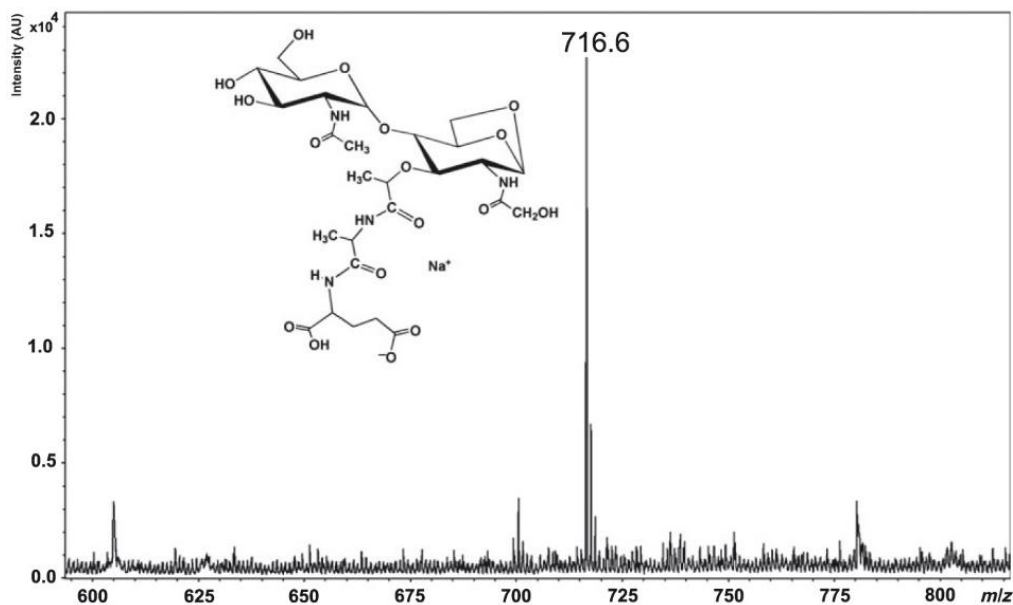


Рис. 2. Масс-спектрометрия супернатанта, полученного после гидролиза микобактериального (Msm) ПГ в присутствии RpfB + RipA.

На врезке продукт гидролиза, соответствующий массе 716,6: N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-ацетил-1,6-ангидромуроамил-L-аланил-D-изоглутамат [46].

стимулированию реактивации НК микобактерий. Этот факт свидетельствует о том, что химический состав муропептидов, образующихся при совместном действии RpfB и RipA, является важным в процессе реактивации покоящихся микобактерий.

Таким образом, установлено, что в одном из механизмов реактивирующего действия Rpf промежуточным звеном является накопление продуктов гидролиза пептидогликана – ангидромуропептидов, образующихся в результате совместного действия с эндопептидазой RipA.

#### IV. ФАКТОРЫ РЕАКТИВАЦИИ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ

Как было указано выше, рост длительно хранившихся клеток *Mtb* мог быть стимулирован введением в среду реактивации фосфолипидов [13]. Позже было исследовано влияние фосфолипидов различного состава на реактивацию НК клеток *Msm*, полученных в условиях недостатка калия [32, 48]. Было выявлено, что в присутствии 200 мкг/мл кардиолипина, фосфатидилхолина или лизо-фосфатидилхолина происходит стимуляция процесса реактивации. Так как единственным компонентом использованных фосфолипидов являются остатки жирных кислот (ЖК), было оценено влияние свободных ЖК различной длины в отношении стимуляции реактивации покоящихся форм *Msm*. Было обнаружено, что присутствие 3.5 мкМ свободных ненасыщенных жирных кислот (СНЖК) в среде роста стимулировало реактивацию ПМ (Рис. 3).

Очевидно, именно СНЖК ответственны за реактивирующий эффект, а фосфолипиды выступают в роли их источников (возможно, за счет действия бактериальных фосфолипаз и эстераз) [13]. Экспериментально было доказано, что при используемых для реактивации

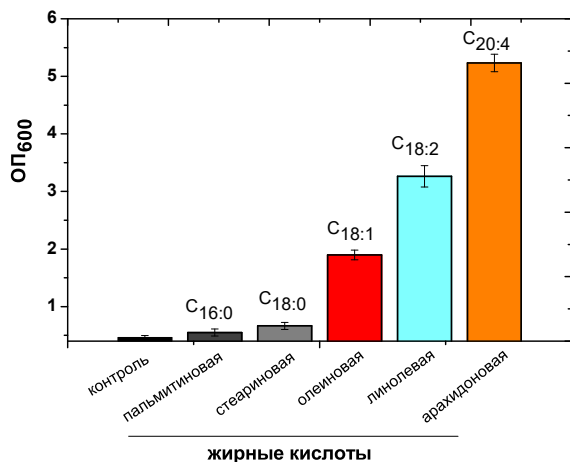


Рис. 3. Эффект добавления жирных кислот (в концентрации 3.5 мкМ) в среду реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* [48].

«Некультивируемые» микобактерии были получены в условиях недостатка калия и реактивированы в жидкой среде с достаточным содержанием калия. Жирные кислоты были внесены в начальный момент реактивации при плотности культуры  $ОП_{600} = 0,3$ .

Эффективность реактивации была оценена через 5 дней.

концентрациях СНЖК, последние не являются разобщителями окислительного фосфорилирования в бактериальных клетках [48]. Очевидно, что в присутствии низких концентраций ЖК запускаются иные механизмы в клетках микобактерий, не связанные с разобщением окислительного фосфорилирования. [49, 50] Принимая во внимание тот факт, что СНЖК были активны при очень низких концентрациях (несравнимых с концентрациями «питательных» субстратов), а также важность их химического строения (активны только ненасыщенные ЖК), их сигнальная роль в реактивации ПМ представляется правдоподобной. Действительно, ЖК участвуют в различных сигнальных каскадах микроорганизмов. Например, арахидоновая кислота является сигнальной молекулой при образовании плодовых тел у *Dictyostelium discoideum* [51]. ЖК служат сигнальными молекулами при дифференцировке *Mycoccus xanthus* [52]. Олеиновая кислота в определенной концентрации вызывает прорастание конидий *Entomophthora culicis* [53].

В выше цитируемых экспериментах *in vitro* были использованы экзогенно добавленные жирные кислоты. В тоже время, свободные ЖК являются естественными метаболитами в организме хозяина. Например, Даниэль с соавторами продемонстрировали, что триацилглицериды (ТАГ) накапливаются в нерепликативных клетках *Mtb* в условиях гипоксии как *in vitro* [49], так и в макрофагах [50]. Можно предположить, что именно ТАГ могут быть источниками внутриклеточных ЖК после ферментативного гидролиза ТАГ. Интересно, что в работе Даниэль и др. продемонстрировано, что свободные ЖК хозяина используются для формирования ТАГ в клетках *Mtb* во время перехода в состояние покоя [49]. Следовательно, ЖК могут участвовать как в образовании покоящихся клеток (в качестве метаболитических субстратов), так и в их реактивации (в качестве триггерного фактора).

## V. ВОВЛЕЧЕНИЕ цАМФ

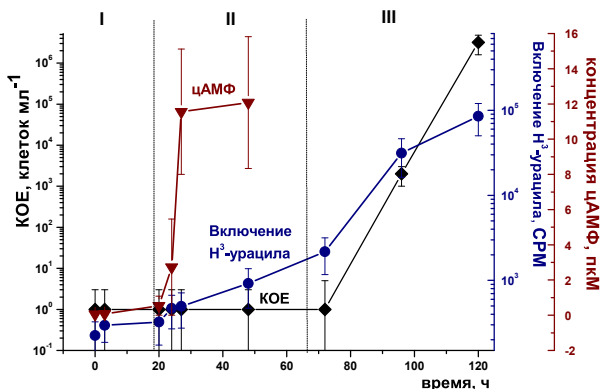
### В РЕАКТИВАЦИЮ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Возможная сигнальная роль ЖК в реактивации ПМ, описанная выше, предполагает наличие системы передачи сигнала внутри клетки. Известно, что одним из регуляторных белков микобактерий, который «чувствует» ЖК во внешней среде, является аденилатциклаза (АЦ). Гены, кодирующие этот белок, известны (у *Mtb* *Rv2212* [54], а у *Msm* –



Рис. 4. Изменение внутриклеточной концентрации цАМФ и включения  $^3\text{H}$ -урацила во время индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*.

«Некультивируемые» микобактерии были получены в условиях недостатка калия и реактивированы в жидкой среде с достаточным содержанием калия. Пунктирные линии делят весь процесс на три фазы: I – истинная лаг фаза, II – метаболическая активация, III – размножение клеток [48].



*MSMEG\_4279* (66% идентичности с *Rv2212*). Было предположено, что реактивация может быть также стимулирована повышением внутриклеточной концентрации цАМФ в результате активации АЦ под действием ЖК. Действительно, добавление в среду 3мМ цАМФ, способного проникать в бактериальные клетки [55] стимулировало реактивацию, аналогично добавлению 3мкМ СНЖК (линоленовой и олеиновой кислот) [48]. В тоже время добавление в среду реактивации цГМФ не привело к стимулированию реактивации НК *Msm*, что указывает на специфическое влияние цАМФ. 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 [48]. За этим увеличением последовало постепенное восстановление клеточного метаболизма, судя по включению радиоактивного урацила, но размножение клеток начиналось только через 72 часа после первоначального контакта с олеиновой кислотой (Рис. 4).

Добавление 8-бром-цАМФ (известного ингибитора АЦ [56]) к среде реактивации полностью устранило реактивацию НК клеток, что доказывает участие АЦ в этом процессе [48].

В аналогичных экспериментах по реактивации НК покоящихся форм *Mtb* была также установлена роль НЖК и цАМФ в этом процессе [48].

В отличие от клеток *Msm*, экзогенно добавленный 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 [48].

Мутантные клетки *Msm* с делецией гена *MSMEG\_4279* ( $\Delta$ АЦ) были способны образовывать НК клетки в условиях недостатка калия, но реактивация в присутствии ЖК у таких клеток отсутствовала. У мутанта  $\Delta$ АЦ внутриклеточные уровни цАМФ оставались очень низкими как с добавлением олеиновой кислоты (в отличие от дикого типа), так и без добавления (аналогично дикому типу) (Рис 5). Однако НК клетки мутанта  $\Delta$ АЦ были способны к реактивации в ответ на экзогенное добавление цАМФ [48].

Интересно, что штамм *Msm* дикого типа, гиперэкспрессирующий АЦ *MSMEG\_4279* (pMind-АЦ), не был способен образовывать НК формы в условиях, идентичных для штаммов дикого типа и  $\Delta$ АЦ [48]. Это коррелировало со значительным увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ в штамме с гиперэкспрессией АЦ по сравнению с контролем во время перехода клеток в НК состояние в постстационарной фазе.

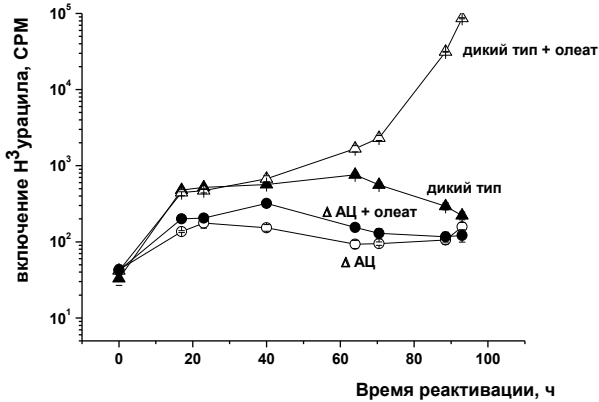


Рис. 5. Участие аденилатциклазы, кодируемой геном *MSMEG\_4279*, в индуцированной олеиновой кислотой реактивации «некультивируемых» микобактерий.

Активация синтеза РНК в бактериях оценена по включению  $H^3$  урацила [48].

Таким образом, АЦ *Msm*, кодируемая геном *MSMEG\_4279*, является потенциальным кандидатом, активация которого вызывает повышенный внутриклеточный уровень цАМФ, наблюдаемый после добавления ЖК к НК клеткам *Msm* (Рис. 4).

Было выявлено также стимулирующее действие ЖК на АЦ Rv2212 *Mtb* (гомолог *MSMEG\_4279*), однако только при низких внутриклеточных концентрациях АТФ [54], сходных с теми, которые обнаруживаются в покоящихся клетках *Msm* [48]). Аналогично *Msm*, олеиновая кислота и дибутирил-цАМФ вызывают реактивацию покоящихся клеток *Mtb*. Это позволило предположить, что механизм ЖК-зависимой реактивации покоящихся форм *Mtb* может быть аналогичен *Msm* [48].

Плейотропные эффекты цАМФ, выступающего в качестве вторичного мессенджера в разнообразных бактериальных процессах, хорошо известны [57]. Участие цАМФ и АЦ в выходе из конститутивного покоя (прорастание спор) также установлено в случае стрептомицетов [58, 59]. Содержание цАМФ в спорах стрептомицетов минимально, однако уровень цАМФ существенно увеличивается во время прорастания спор, а затем снова снижается во время поздней фазы роста мицелия [58]. Мутант *Str. coelicolor* с делецией АЦ был дефектен в отношении прорастания спор, и этот фенотип мог быть устранен добавлением цАМФ в концентрации выше 1 мМ [57]. В более поздней работе был описан рецептор для цАМФ в *Str. coelicolor*, который оказался гомологичен белку Стр в *E. coli*. Белок Стр, содержащий цАМФ-связывающий домен, контролирует экспрессию *lac*-оперона *E. coli*. [60]. Мутанты стрептомицета с делецией гена *Crp*-подобного белка, 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-Стр играет важную роль в контроле прорастания спор у *Str. coelicolor* [59]. В отличие от *Streptomyces*, споры амёбы *Dictyostelium discoideum* содержат в 10 раз больше цАМФ, чем активно размножающиеся клетки [56]. В начале прорастания спор внутриклеточная концентрация цАМФ временно возрастала, что аналогично тому, что происходит во время прорастания спор *Streptomyces*. Высокий уровень цАМФ снижался только после прорастания спор [56].

Последующие процессы, которые связывают повышение уровня цАМФ с реактивацией микобактерий, пока не ясны. У *Mtb* описаны два транскрипционных фактора, чувствительных к цАМФ внутри клетки: CRPMt (Rv3676) и Cmr (Rv1675c) [61]. Cmr имеет более 300 сайтов связывания с бактериальной хромосомой и, таким образом,

потенциально может участвовать в регуляции широкого спектра метаболических процессов [62]. В контексте настоящего обзора стоит упомянуть, что цАМФ модулирует связывание *Strg* с генами, принадлежащими к «регулону дормантности» *DosR*, что важно для выживания *Mtb* в условиях гипоксии в нерепликативном состоянии [63]. CRPMt также демонстрирует плейотропные эффекты, включая контроль биосинтеза аминокислот [64], экспрессию гена *RpfA* и экспрессию сукцинатдегидрогеназы (*Rv0247c-Rv0249c*) [65].

В *Mtb* гомологом MSMEG\_4279 является АЦ *Rv2212*, которая считается основным продуцентом цАМФ среди 16 биохимически активных АЦ-кодирующих генов, и которая способствует поддержанию активного метаболического состояния *Mtb* в стрессовых условиях [54]. Было предположено, что АЦ *Rv2212*, подобно MSMEG\_4279 и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (цАМФ-ТФ) *Rv3676*, также стимулируют реактивацию покоящихся бактерий вследствие увеличения продукции внутриклеточного цАМФ [66, 67]. Действительно, клетки *Mtb* с гиперэкспрессией АЦ *Rv2212* (*pMindRv2212*) или регулятора CRPMt (*pMindRv3676*) росли быстрее по сравнению с контрольным штаммом. Бактерии штамма *pMindRv2212* быстро восстанавливаются из старого инокулята и из высушенных образцов в отличие от клеток контрольного штамма [66]. Формирование НК бактерий штаммов *pMindRv2212* или *pMindRv3676* наблюдалось значительно позже по сравнению с бактериями контрольного штамма *pMind*. НК бактерии штаммов *pMindRv2212* и *pMindRv3676* демонстрировали значительно более короткую лаг-фазу и более быструю реактивацию по сравнению с контрольным штаммом *pMind* [66–68]. Таким образом, эти эксперименты также свидетельствуют в пользу предположения о вовлеченности цАМФ и цАМФ-зависимых регуляторных факторов в размножении и реактивации ПМ *in vitro*. Этот вывод был подтвержден в экспериментах *in vivo* при изучении избыточной экспрессии *Rv2212* и *Rv3676* в клетках *Mtb* на развитие реальной туберкулезной инфекции у мышей [66]. Оказалось, что даже в отсутствие селекции под действием антибиотика клетки, высеваемые из зараженных органов, 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 тем, что при высевах из органов колонии штаммов с гиперэкспрессией изучаемых генов были заметно увеличены по сравнению с колониями контрольного штамма, развивающимися в идентичных условиях (Рис. 6). Также клетки патогенов с гиперэкспрессией генов *Rv2212* или *Rv3676* проявляли повышенную вирулентность по сравнению с контрольным штаммом (Рис. 7).

Таким образом, обобщая обсуждаемые выше эксперименты, обнаруживается 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 [66, 67].

Штамм *M. bovis* с гиперэкспрессией *Rv2212* демонстрировал значительное ускорение роста по сравнению с контрольным штаммом в макрофагах мышей, то есть в стрессовых условиях для внутриклеточного паразита [69]. Подобно этому, гиперэкспрессия *Rv2212* в клетках *Msm* приводила к повышенной выживаемости бактерий в макрофагах [65].

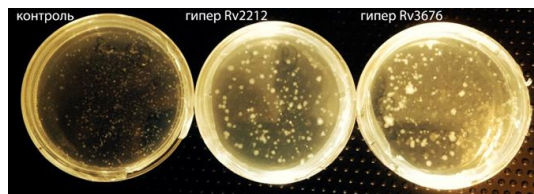


Рис. 6. Различия в росте колоний штаммов *M. tuberculosis* pMindRv2212, pMindRv3676 и контрольного pMind, выделенные из легких зараженных мышей [66, 67].

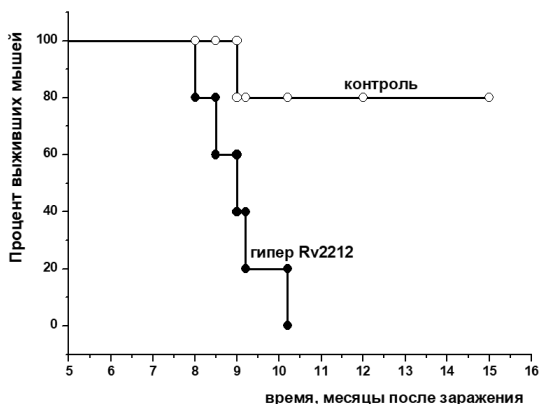


Рис. 7. Вирулентность мутантных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* pMindRv2212 (обладающего повышенной аденилциклазной активностью) и pMind (дикого типа, обладающего обычной аденилатциклазной активностью) *in vivo*.

Мышей инбредного штамма В6 инфицировали штаммами pMindRv2212 (закрашенные кружки) или pMind (незакрашенные кружки) [66].

Во-вторых, важность продукции цАМФ была подтверждена в экспериментах по образованию НК покоящихся бактерий *in vitro* в условиях закисления среды [66]. Гиперэкспрессия АЦ приводила к длительному поддержанию способности бактерий образовывать КОЕ и к существенной задержке или даже предотвращению бактериального перехода в состояние покоя [66]. В-третьих, повышенная экспрессия Rv2212/Rv3676 и выработка цАМФ существенно стимулировали восстановление *Mtb* из НК, покоящегося состояния и промотировали рост микобактерий [66, 67]. 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. 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. 7). Формально это противоречит результатам, полученным для штамма *M. bovis* BCG с гиперэкспрессией Rv2212, который продемонстрировал одинаковое поведение с контрольным штаммом в организме мыши [64]. Это различие может быть связано с различной локализацией *Mtb* и *M. bovis* BCG в организме хозяина. Было установлено, что высоковирулентные штаммы микобактерий, например *Mtb* и *M. leprae*, легко мигрируют из фагосом в цитозоль миелоидных клеток и продолжают свою репликацию в этом новом клеточном компартменте [70]. Различия во внутриклеточных концентрациях цАМФ могут по-разному влиять на выживаемость микобактерий, находящихся в фагосомах и цитозоле.

Существует достаточно доказательств важной роли синтеза цАМФ для выживания патогена в клетках-хозяевах. Так, высокие концентрации цАМФ, секретируемые

*Mtb* в макрофагах, ингибируют слияние фагосомы с лизосомой, увеличивая выживаемость микобактерий [71-73]. В тоже время высокие внеклеточные концентрации цАМФ, секретируемые микобактериями внутри макрофага, приводят к эффекту их «интоксикации» [74]. цАМФ влияет на экспрессию генов, участвующих в микобактериальном ответе на условия гипоксии, часто присутствующие *in vivo* [75]. Высокие концентрации цАМФ увеличивают устойчивость микобактерий к стрессовым условиям за счет повышения экспрессии шоковых белков GroEL и DnaK [64]. Кроме того, цАМФ непосредственно регулирует активность таких ферментов, как малатдегидрогеназа [75] и лизинацетилаза (Rv0998) [61], участвующих в центральных микобактериальных метаболических путях [76]. Эти разнообразные эффекты вполне могут объяснить лучшую выживаемость *in vivo* штамма с гиперэкспрессией Rv2212.

Резюмируя вышеприведенные данные, можно предполагать, что повышение продукции цАМФ происходит благодаря активации АЦ Rv2212 под действием ненасыщенных жирных кислот, что в свою очередь увеличивает продукцию белка RpfA через активацию цАМФ-ТФ Rv3676. Как правило, эти события играют «антипокоящуюся» роль, поддерживая активное состояние *Mtb* в неблагоприятных условиях в культуре и размножение внутри хозяина.

#### СВЯЗЬ МЕЖДУ Rpf, цАМФ И ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

В присутствии низкомолекулярных соединений семейств нитрофенилтиоцианатов (НФТ), являющихся ингибиторами активности белков Rpf [77], наблюдалось значительное подавление реактивации как НК клеток *Msm*, так и НК форм *Mtb* [78]. Интересно, что на ранних этапах НФТ не оказывали эффекта на процессы, происходящие в реактивации, индуцированной олеиновой кислотой.

На более поздних этапах реактивации НФТ, очевидно, ингибирует активность Rpf, тем самым предотвращая размножение клеток *Msm* [48]. Подобный эффект для НФТ был обнаружен и в случае цАМФ – индуцируемой реактивации НК клеток *Msm* [48]. Эти эксперименты демонстрируют, что ЖК-индуцированная реактивация НК клеток *Msm* связана с белками семейства Rpf.

Анализ уровня экспрессии этих генов *rpf* выявил, 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 [48].

Через 67 часов, в ранней логарифмической фазе, для *rpfA* выявлено значительное увеличение уровня экспрессии, тогда как уровни экспрессии *rpfB* и *rpfF* демонстрировали незначительные изменения. В контрольной культуре (без добавления СНЖК) количество копий генов *rpfA*, *rpfB* и *rpfF* оставалось постоянным в течение всего эксперимента. 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. Рикман с соавторами [63] предположили, что CRPMt (Rv3676), положительно регулирующий экспрессию RpfA, может контролировать реактивацию покоящихся клеток *Mtb*. У *Corynebacterium glutamicum* ген *rpf2* (гомолог *rpfB* у *Mtb*) также находится под поло-

жительным контролем цАМФ-зависимого регулятора транскрипции GlxR, который является гомологом Rv3676 [79]. Таким образом, активация экспрессии *rpfA* происходит одновременно с началом размножения клеток, которое происходило спустя некоторое время после того, как внутриклеточный уровень цАМФ увеличился (Рис. 4). RpfA может, следовательно, влиять на ускорение размножения клеток посредством Rpf-зависимого ремоделирования клеточной стенки [36] в качестве позднего события реактивации. Действительно, секреция белков Rpf в культурах *Msm* коррелировала с активным ростом, но не с лаг-фазой [32]. В то же время, ЖК опосредуют свое действие через цАМФ на начальных этапах этого процесса, что приводит к активации клеточного метаболизма (метаболической реактивации), (фаза I, рисунок 4), и не похоже, что их роль, напрямую связана с активностью Rpf. Наиболее вероятно, что белки Rpf начинают играть свою роль в реактивации НК *Msm* на поздних этапах в начале размножения клеток (фаза II, рисунок 4).

## VI. РОЛЬ ТРЕГАЛОЗЫ/ТРЕГАЛАЗЫ В РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

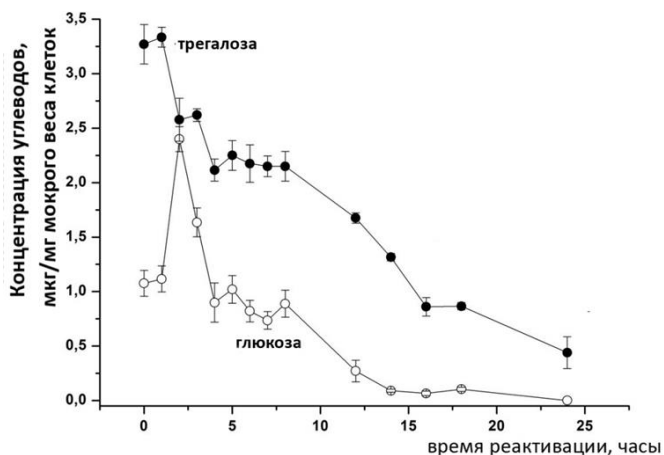
При реактивации ПМ, хранившихся в течение 3.5–5 месяцев в закисленных культурах при комнатной температуре, в свежей жидкой среде наблюдается выраженная лаг фаза (до 6–8 часов). Очевидно, что в этот момент не происходят активные биосинтетические процессы, что следует из низкого уровня дыхания [80], отсутствия синтезов белков и РНК [81]. Возможно, в этой фазе происходят некие катаболические процессы, включающие запасенные в покоящихся клетках эндогенные метаболиты. Экспериментально было установлено, что уровень трегалозы, накапливающейся в больших количествах в покоящихся клетках *Msm* снижается в начальный период реактивации (Рис. 8), что происходит задолго до начала синтезов РНК и белка [81]. Это сопровождается резким кратковременным подъемом концентрации глюкозы (Рис. 8). После начала размножения реактивированных микобактериальных клеток количество внутриклеточной трегалозы соответствовало уровню трегалозы в активно растущих микобактериях логарифмической фазы роста. Очевидно, что снижение уровня внутриклеточной трегалозы происходит вследствие ее гидролиза с образованием глюкозы. Однако, концентрация внутриклеточной глюкозы снижалась после пяти часов реактивации до уровня содержания глюкозы в активно растущих микобактериях [81]. Возможно, уменьшение концентрации глюкозы в реактивирующихся микобактериальных клетках происходит благодаря активации гликолитического пути и запуску метаболизма в целом. Действительно, ферменты гликолиза присутствуют в протеоме в период покоя микобактерий [82–84].

Активность трегалазы (фермента, расщепляющего трегалозу с образованием глюкозы) в реактивирующихся клетках *Msm* увеличивается в начале реактивации, хотя в дальнейшем уровень активности трегалазы флуктуировал [81].

Выявленные изменения количества трегалозы и активности гидролизующего ее фермента в процессе реактивации ПМ указывают на важность гидролиза этого дисахарида (0–12 ч). Было выявлено, что в присутствии валидамицина А (VM-A ингибитор трегалаз, в том числе бактериальных [85]) происходит выраженное замедление процесса реактивации и деления клеток. Очевидно, что гидролиз трегалозы важен на ранней стадии реактивации ПМ, особенно для НК покоящихся форм *Msm* [81].

Снижение концентрации внутриклеточной трегалозы и активация трегалазы в период начальных стадий реактивации ПМ сходны с процессом, происходящим при

Рис. 8. Изменения уровня внутриклеточной трегалозы (закрашенные символы) и глюкозы (пустые символы) в покоящихся формах *M. smegmatis* при реактивации [81].



прорастании спор актиномицетов и дрожжей [86, 87]. Так же, как в спорах дрожжей и грибов [87–90], активность трегалазы при реактивации покоящихся клеток *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 через 12–14 часов после засева клеток в свежую жидкую среду. Возможно, наблюдаемая активация связана с гидратацией ПМ в первые часы реактивации, как это было установлено для спор стрептомицетов [91]. На более поздних стадиях реактивации на активность трегалазы влияет уровень АТФ в клетках [81], как это имеет место в случае трегалазы дрожжей [90].

Таким образом, активация трегалазы на ранних стадиях реактивации ПМ сопровождается снижением уровня трегалозы и возрастанием концентрации глюкозы, которая может использоваться клеткой на этих стадиях в качестве источника углерода и энергии.

## VII. РОЛЬ ПРЕВРАЩЕНИЙ СВОБОДНЫХ ПОРФИРИНОВ В РЕАКТИВАЦИИ

Другим соединением, которое накапливается в покоящихся формах *Msm* является тетраметилловый эфир копропорфина (ТМК) [92]. Метилированные порфирины являются крайне гидрофобными молекулами и одним из базовых предположений относительно их поведения в рамках живой системы может быть их встраивание в другие гидрофобные участки клетки. Например, в цитоплазматическую мембрану или в наружную оболочку из миколовых кислот. Один из вероятных эффектов от их присутствия может проявиться в модуляции структурного состояния липидного бислоя мембран и изменения его микровязкости. Повышение вязкости липидного матрикса может сыграть положительную роль в защите клетки от повреждений, так как замедлит диффузию любых токсичных для микобактерии веществ. Другое возможное следствие может проявиться в замедлении функционирования мембраносвязанных ферментов и ферментных систем. Было установлено, что при повышении внутриклеточной концентрации ТМК, вызванном добавлением к среде роста 5-аминолевулиновой кислоты, в

микобактериях наблюдается увеличение микровязкости мембран и снижается активность дыхательной цепи. Эти же процессы происходят и в покоящихся формах *Msm*, образованных в условиях постепенного закисления внешней среды [93]. Сходные эффекты наблюдались в цитоплазматических мембранах *E. coli*, в которых варьировало соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Это приводило к значительному изменению вязкости мембраны и к снижению активности дыхательной цепи, предположительно из-за замедления диффузии низкомолекулярных электронных переносчиков внутри мембраны [94]. Логично ожидать обратимости указанных выше структурных изменений, обнаруженных в состоянии покоя, при реактивации ПМ в полностью репликативные клетки. Действительно, микровязкость мембран реактивирующихся бактерий, оцененная по анизотропии BODIPY FL C16 уменьшалась между 4 и 8 часами реактивации (Рис. 9), возвращаясь к значению, близкому к анизотропии для активно растущих микобактерий [93]. Начиная с этого момента времени наблюдалось увеличение дыхательной активности клеток, контролируемое активностью мембранно-связанных переносчиков (Рис.9). Эти изменения происходили до того, как микобактериальные клетки постепенно увеличивались в диаметре в процессе реактивации [80]. Состав основных жирных кислот фосфолипидов цитоплазматической мембраны, которые могут отвечать за изменения микровязкости [95, 96] существенно не менялся до 10 ч реактивации [93]. Очевидно, трансформация жирных кислот не является причиной снижения микровязкости мембран, по крайней мере, при ранней (до 8 ч) реактивации покоящихся форм *Msm*. В то же время концентрация ТМК в бактериальных клетках снижалась через 5 ч от начала реактивации, достигая минимальной концентрации через 20 ч (Рис. 9). Это может указывать на роль тетраметилкопропорфирина в переходе липидного матрикса мембран к более текучей структуре, характерной для размножающихся клеток [93].

Таким образом, на ранней стадии реактивации ПМ происходит довольно быстрое деметилирование мембранного порфирина с образованием копропорфирина, который может быть использован в синтезе гема [97] и гемсодержащих белков, например цитохромов. Очевидно, что в этом процессе участвуют пока неизвестные деметилазы ТМК.

## VIII. ОМИКИ ПРОЦЕССА РЕАКТИВАЦИИ (ТРАНСКРИПТОМ, ПРОТЕОМ, МЕТАБОЛОМ)

Хотя исследования реактивации с применением омиксных подходов немногочисленны, они, теоретически, позволяют охарактеризовать общую картину происходящих изменений в клетке на уровне отдельных транскриптов, белков, липидов и низкомолекулярных метаболитов.

Данные по реактивации *Mtb*, полученные разными исследователями, имеют целый ряд отличий и противоречий, связанных с использованием различных моделей покоя, временем нахождения в покоящемся состоянии, отличающимися условиями реактивации, применением разных методов для анализа экспрессии генов, белков и метаболитов и условий их применения [98, 99].

Чаще всего для изучения реактивации используют ПМ, полученные в модели Вейна, эффективной и простой модели, основанной на постепенном истощении доступного кислорода при выращивании микобактерий [100, 101], хотя эта модель и не соответствует состоянию глубокого покоя. В работе Ионы с соавторами при изучении транскрипции 51 гена методом RT-PCR было продемонстрировано, что *Mtb*, культивируемые в усло-



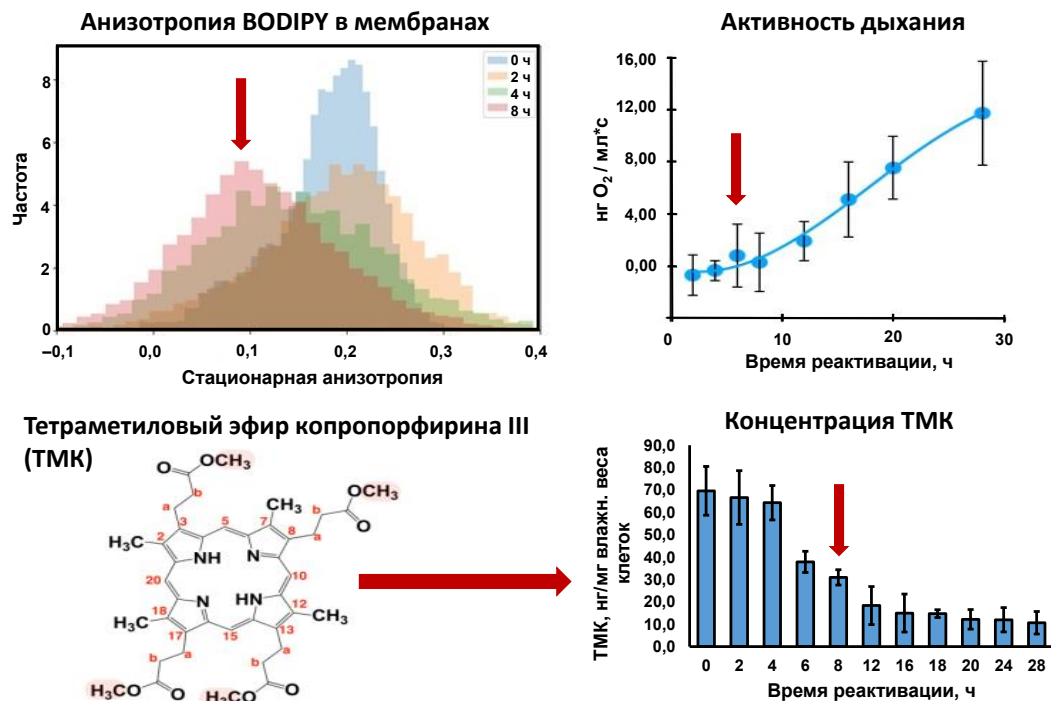


Рис. 9. Изменение микровязкости мембран, активности дыхательной цепи и концентрации метилированного порфирина при реактивации покоящихся форм *M. smegmatis*.

Микровязкость мембран оценена по изменению анизотропии флуоресценции мембранного зонда BODIPY FL C-16. Вертикальная стрелка указывает момент изменения микровязкости в период реактивации [92, 93].

виях гипоксии, при попадании в аэробные условия и свежую среду быстро восстанавливаются, при этом экспрессия генов, кодирующих синтез некоторых белков, повышается уже в первые часы при попадании в благоприятные условия [22]. Согласно сходной работе Шерид с соавторами [102], реактивация культуры *Mtb* приводила к повышению активности некоторой части генов в первые часы реактивации, основная масса генов была активирована после 12 часов.

В экспериментах с реактивацией НК клеток *Mtb* был выявлен феномен «транскрипционного всплеска», характеризующийся активацией транскрипции определенных генов и значительным увеличением (в 10–20 раз) синтеза мРНК *de novo* в первые 24 ч, т.е. временем, соответствующим одной генерации [103].

В исследовании изменений протеома, Шуберт с соавторами также использовали модель Вейна для получения покоящихся форм *Mtb*. Реактивацию проводили в аэробных условиях, но без добавления свежей питательной среды, что приводило к повышению экспрессии белков только через 6 часов от начала реактивации [104].

Обобщая полученные данные в этих и других работах, можно выделить следующие биохимические процессы, происходящие при реактивации:

– Деление клеток, репликация и репарация ДНК

Согласно работе Ионы с соавторами была отмечена индукция следующих генов: маркеры репликации *dnaA* и *ftsZ* были сильно индуцированы во время восстановления роста клеток [22]. DnaA (Rv0001) – инициатор репликации ДНК [105], индукция которого повышалась уже в первые часы, достигая максимума через 10 часов от начала реактивации; *ftsZ* (Rv2150c) – центральный белок, участвующий в процессе клеточного деления [106], характеризовался постоянным увеличением экспрессии, с достижением максимального уровня через 72 часа от начала реактивации. По-видимому, репарация ДНК имеет решающее значение при реактивации. Дю с соавторами выявили повышенную регуляцию большинства генов, связанных с *LexA*-опосредованным SOS-ответом [107], среди них *ruvA*, *ruvC* и *dnaE2* непосредственно связанные с репарацией ДНК [108]. SOS-ответ заключается в активации путей репарации нуклеиновых кислот под действием SOS-системы в ответ на повреждения ДНК, вызванными различными стрессами (УФ излучение, химические агенты, антибиотики). SOS-система включает в себя набор генов, регулируемых белками RecA и LexA [107, 109]. На раннем этапе реактивации было выявлено появление Rv0631c (*recC*), Rv2985 (*mutT1*) и Rv3014c (*ligA*), которые участвуют как в репликации, так и в репарации ДНК. На более поздней фазе реактивации был повышен уровень целого ряда белков (Rv0054 (*ssb*), Rv0631c (*recC*), Rv2985 (*mutT1*), Rv3102c (*ftsE*), Rv0006 (*gyrA*), Rv3917c (*parB*), Rv3014c (*ligA*), Rv3646c (топоизомер ДНКазы I *TopA* omega) и Rv2973c (АТФ-зависимая ДНК-хеликаза *recG*) [110].

– Факторы транскрипции

Активация факторов транскрипции происходит уже в первые часы (1-3 ч) после переноса *Mtb* в свежую среду [22]. В начальной фазе реактивации увеличиваются факторы транскрипции: *rpoB* (Rv0667) (кодирует  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы) и сигма факторы *sigB* (Rv2710), *sigE* (Rv1221), *sigF* (Rv3286c), *sigH* (Rv3223) (факторы инициации транскрипции), со временем происходит медленное снижение их экспрессии, за исключением *sigA* (Rv2703), который показывает высокий уровень транскрипции в течение всего процесса реактивации [22]. По данным Шуберт с соавторами, применившим оценку абсолютных концентраций клеточного белка в масштабе всего протеома на основе SWATH масс-спектрометрии, уровень сигма факторов SigE и SigB также повышается на начальном этапе реактивации [104]. При исследовании транскриптома при реактивации покоящихся форм *Mtb*, полученных на среде с дефицитом калия, на начальном этапе реактивации выявили повышение *sigD* (Rv3414c) [23]. Большинство из выявленных сигма факторов являются важными на любой стадии роста. Почти все модели *in vitro* подтвердили, что *sigE*, *sigH* и *sigB* индуцируются также во время покоя [22, 104, 111–114].

Анализ SWATH выявил, что уровень экспрессии транскрипционного регулятора ClgR (Rv2475c) повышается в начале реактивации, после чего уровень экспрессии белка снижается до исходного уровня в течение двух дней. Эти данные подтверждаются другой группой исследователей на основе ПЦР в реальном времени [114].

Согласно протеомным данным Гопината с соавторами, полученным при реактивации *Mtb* на модели Вейна, регулятор транскрипции, Rv0386, относящийся к семейству LuxR, а также Rv1219 и Rv0494 (регулятор транскрипции семейства GntR) были обнаружены только на первом этапе реактивации, а Rv3183, Rv3060, Rv0339c (другие представители семейства LuxR), присутствовали только на втором этапе реактивации [110].

– *Метаболизм аминокислот*

Гопинат с соавторами показали, что метаболизм аминокислот значительно активировался при реактивации *Mtb*, при этом через 6 часов повышается синтез белков, которые относятся к метаболизму триптофана, метионина, глутамина [110], а через 24 часа повышается регуляция белков, участвующих в метаболизме цистеина и гистидина [110]. Синтез белков, которые относятся к метаболизму глицина, лизина, аргинина, пролина, аспарагиновой кислоты, гомоцистеина, треонина, фенилаланина и аминокислот с разветвленной цепью повышался на обеих стадиях реактивации [110].

– *Метаболизм липидов*

При изучении липидного состава реактивирующихся нерепликативных клеток *Mtb*, образованных в условиях гипоксии, было установлено, что в этих покоящихся формах наблюдается заметное снижение всех форм миколовых кислот. И наоборот, при реактивации происходит увеличение количества свободных миколовых кислот [115].

По данным Дю с соавторами при реактивации происходит индукция многих генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в синтезе миколовых кислот, димикоцерозат фтиоцерола (PDIM), сульфолипидов. Так, повышается уровень экспрессии *fabH*, фермента, инициирующего биосинтез жирных кислот II типа. Микобактерии необычны тем, что они обладают синтазами жирных кислот двух типов: I – FAS-I, катализирует образование коротких предшественников для удлинения цепи жирных кислот; II – FAS-II, участвует в биосинтезе миколовых кислот. Во время синтеза миколовых кислот *fabH* служит связующим звеном между двумя системами FAS [116]. Гены, кодирующие ключевые ферменты FAS-II, такие как *fabG1* и *inhA*, также были индуцированы в лаг фазе реактивации [107, 117]. Была активирована группа генов (*mas*, *fadD26* и *ppsA-E*), участвующих в синтезе и транслокации PDIM, важного липидного компонента клеточной стенки *Mtb* [107]. Также были индуцированы несколько генов *pks* (*pks1*, *pks4*, *pks7*, *pks8* и *pks15*), кодирующих поликетидсинтазы (ферменты, синтезирующие вторичные метаболиты), которые участвуют в синтезе сложных липидов, в том числе сульфолипидов [107].

Полученные данные показывают усиленный синтез основных липидов клеточной стенки *Mtb* при подготовке к делению клеток.

– *Система токсинов–антитоксинов*

Несколько пар токсинов и антитоксинов также демонстрировали экспрессию при реактивации: токсины Rv0299 и Rv1246c (*relE*) уникальны для ранней стадии реактивации (через 6 часов от начала реактивации) и антитоксин Rv0298 специфичен на более поздней фазе реактивации (через 24 часа от начала реактивации) (данные протеома) [110]. Значение такой дифференциальной регуляции для процесса реактивации остается неясным. Однако экспрессия *varB12*, кодирующего антитоксин Rv1721c увеличивается в начале реактивации (данные транскриптома) [103].

– *Шапероны*

На начальном этапе реактивации увеличивается экспрессия универсального стрессового белка Rv2005c, с последующим снижением на втором этапе реактивации (по данным протеома) [110], а также увеличивается уровень экспрессии гена *hsp*, кодирующего белок теплового шока – шаперон Rv0251c [103]. Во время реактивации ПМ, полученных в условиях недостатка калия, было зарегистрировано увеличение уровня экспрессии эндопептидазы *clpB* (Rv0384c) [23], которая удаляет окисленные белки, тем самым способствуя восстановлению *Mtb*, повышая шансы бактерии к выживанию [117]. При реактивации ПМ, образованных в условиях гипоксии, повышается уровень

экспрессии семи генов, кодирующих протеазы, среди которых *clpP1*, *clpP2* и ассоциированная с ними *clpC1* [102]. Эти протеазы участвуют в деградации неправильно свернутых внутриклеточных белков [102]. Данные, полученные Шерид с соавторами по повышению экспрессии *clpP* на начальном этапе реактивации [102], подтверждаются другой группой исследователей [114].

– *Системы секреции*

Переход из состояния покоя к реактивации характеризовался также активацией системы секреции ESX-5 [107, 110]. Система ESX-5 опосредует секрецию большинства белков семейства PE/PPE [118] с полностью неустановленными функциями, но, возможно, являющимися факторами вирулентности микобактерий [119]. Подмножество секретируемых белков остается в клеточной оболочке, где они важны для изменения проницаемости клеток и поглощения гидрофобных источников углерода [120].

– *Энергетический метаболизм и цепь переноса электронов*

По данным Шерид с соавторами, АТФ-синтаза, оксидоредуктаза (Rv1774), цитохром С-оксидаза были активированы при реактивации клеток покоящихся *Mtb* в модели Вейна, что сопровождается увеличением дыхательной активности во время реактивации и предполагает возобновление окислительного фосфорилирования (данные транскриптомного анализа) [102]. Однако по данным Шуберт с соавторами уровень АТФ-синтазы F0F1 существенно не менялся и оставался на стабильно высоком уровне на протяжении всего эксперимента, т.е. и в состоянии покоя, и при реактивации (протеомные данные) [104]. На начальном этапе реактивации активируются также гены, кодирующие ферменты цикла трикарбоновых кислот (*glcA2*, *icd2*, *sdhB*) [22].

Реактивация покоящихся форм *Msm*, образованных в условиях закисления среды [121], характеризуется длительной лаг-фазой, за которой следует фаза метаболической активации. Однако даже в первую фазу реактивации (0–10 ч) происходят существенные изменения, связанные, например, с развитием мембранного потенциала [80].

– *Метаболизм углерода*

Повышение экспрессии PrpC (Rv1131) и PrpD (Rv1130) отмечается не только в покое, но и на начальном этапе реактивации. Оперон *prpDC* кодирует два фермента, метилцитратдегидратазу Rv1131 (*prpC*) и метилцитратсинтазу Rv1130 (*prpD*), которые участвуют в метилцитратном пути. Считается, что у бактерий метилцитратный цикл участвует в детоксикации. Этот путь обеспечивает превращения токсичного пропионил-КоА, который образуется при катаболизме определенных липидов [122]. В частности, в *Mtb* пропионил-КоА образуется в результате β-окисления жирных кислот с нечетным количеством атомов углерода, расщепления холестерина и катаболизма некоторых алифатических аминокислот.

Активация центральных метаболических путей заканчивается инициацией клеточного деления, которой предшествует инициация трансляции. Выявлены гены с повышенной индукцией на этапе трансляции (*rplL*, *rplP*, *rplX*, *rpsA*, *rpsQ*, *trmU*) [23].

При реактивации НК *Mtb*, образующихся при дефиците ионов калия в среде, наблюдалась быстрая активация транскрипции *de novo* с активацией генов, контролирующих разные ключевые метаболические пути и размножение клеток [103]. Подобный одновременный запуск многих биохимических путей в процессе реактивации микобактерий наблюдали и на уровне протеома [104], а также при анализе метаболома [80].

В работе, в которой изучали изменение метаболома в реактивирующихся клетках *Msm*, в интервале времени 0–10 ч наблюдалось значительное увеличение убихинонового

кофермента Q9, что коррелирует с активацией клеточного дыхания. Наблюдалось также заметное накопление янтарной и фумаровой кислот в период покоя, причем при реактивации концентрации этих кислот снижались. В целом же, эти эксперименты показали, что в процессе реактивации происходит снижение концентрации многих метаболитов, возможно запасенных в клетках в период покоя. Изменение содержания метаболитов при реактивации может наводить на мысль о том, какие метаболические процессы активируются на разных фазах реактивации. Так, кроме активации энергетических процессов на ранних этапах реактивации, были выявлены некоторые специфические пути, такие как изменение метаболизма липидов, глицерофосфолипидов, инозитола и т. д. [80]. Активация пуринового и пиримидинового обмена свидетельствует о начале биосинтеза нуклеиновых кислот и начале транскрипции.

В целом, результаты «омических подходов» при изучении процесса реактивации ПМ свидетельствуют об одновременной активации определенных ограниченных участков метаболических путей. Скорее всего эти процессы протекают стохастически, и не представляет собой упорядоченной последовательности какого-то одного процесса. Окончание реактивации знаменуется активацией всех биохимических процессов в клетке [80].

### IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реактивация микобактерий из покоящегося состояния является сложным процессом, включающим несколько стадий и биохимических превращений. В зависимости от используемой модели образования покоящегося состояния и «глубины» покоя эти процессы различаются. Так, например, при реактивации клеток микобактерий из нерепликативного состояния в часто используемой модели Вейна, наблюдается очень быстрое восстановление основных метаболических процессов в клетке [22, 104, 110]. Однако при реактивации НК микобактерий из состояния длительного покоя процесс восстановления, очевидно, более сложен, растянут во времени и может быть разделен на три стадии (Рис. 4): I – истинная лаг фаза, связанная с катаболическими реакциями, II – фаза, при которой происходит активация биосинтетических и других метаболических реакций, III – начало деления клеток.

На первой стадии биосинтетические процессы не происходят. На рисунке 10 представлена схема процессов, происходящих при реактивации покоящихся микобактерий. Катаболические реакции стадии I включают, по крайней мере, гидролиз трегалозы под действием трегалазы с высвобождением глюкозы и повышением уровня АТФ (скорее всего за счет утилизации глюкозы в цепи гликолиза). На этой же стадии происходит деметилирование метиловых эфиров копропорфиринов, приводящее к снижению микровязкости липидного матрикса мембран. Последнее должно сказываться на функционировании мембраносвязанных ферментов и ферментных систем, таких как дыхательная цепь. На стадии II происходит активация аденилатциклазы, приводящая к повышению уровня цАМФ в клетке. Обладая плеiotропным эффектом цАМФ может активировать значительное число реакций, которые в итоге приводят к началу синтеза макромолекул (РНК, белков) и активации общего метаболизма.

Одним из следствий повышения цАМФ является активация цАМФ-зависимого транскрипционного фактора (Rv3676), 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. При этом проис-

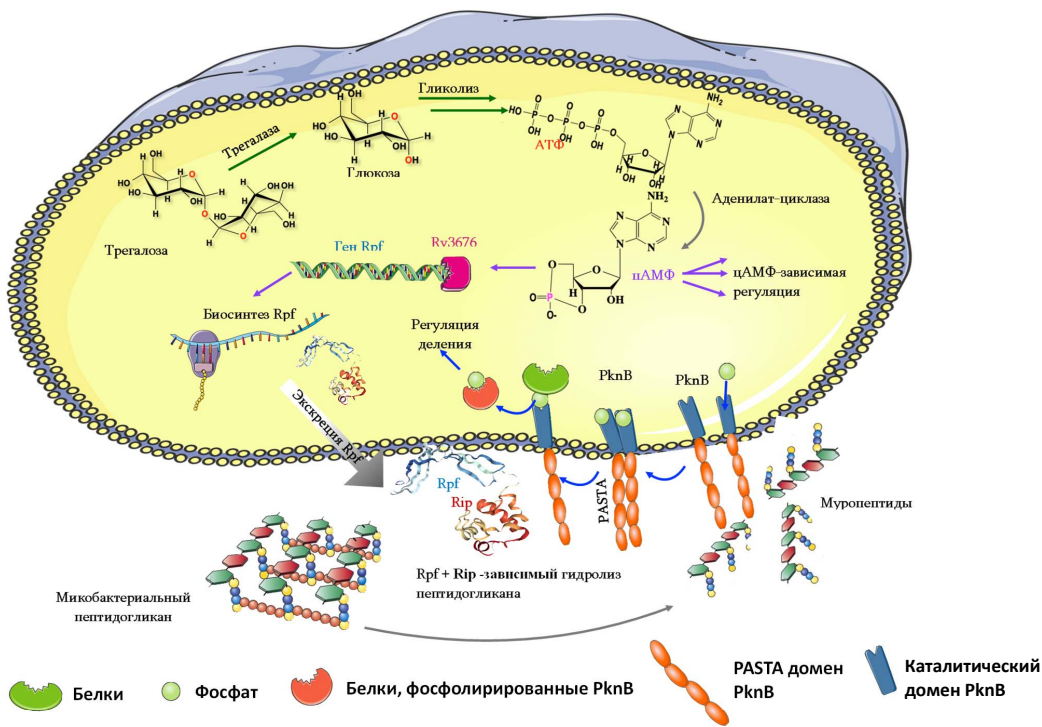


Рис. 10. Процессы, происходящие при реактивации покоящихся микобактерий.

ходит образование сигнальных муропептидов, взаимодействие которых с PknB приводит к ее димеризации с последующим автофосфорилированием и активацией. PknB фосфорилирует определенные белки и тем самым может регулировать деление клеток (стадия III) (Рис. 10).

Необходимо отметить, что данное деление реактивации на стадии может быть довольно условным. Так, метаболомный анализ демонстрирует, что в фазе I наряду с катаболическими процессами происходят также и другие метаболические реакции, приводящие к увеличению содержания определенных метаболитов в реактивирующихся клетках. Интересно, что возможная последовательная цепь активируемых метаболических процессов, связанная с синтезом соответствующих ферментов, также как и отдельных реакций внутри этих процессов во времени реактивации пока не установлена. Скорее всего, отдельные звенья метаболизма активируются стохастически, независимо друг от друга, так что целая «метаболическая карта», характерная для активных клеток, создается лишь перед началом деления клеток.

Разумеется, наши знания о механизмах и процессах, лежащих в основе реактивации ПМ, полученные на сегодняшний день не полны и фрагментарны. Тем не менее, уже сейчас они являются хорошей основой для создания новых лекарственных средств, направленных на подавление перехода патогенных микобактерий из латентного в активное состояние.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-15-00221, разделы «Введение», «Условия реактивация покоящихся форм микобактерий», «Роль превращений свободных порфиринов в реактивации», «Омики процесса реактивации» и «Заключение») и государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН (разделы «Роль секретируемых факторов в реактивации покоящихся микобактерий», «Факторы реактивации липидной природы», «Вовлечение цАМФ в реактивацию покоящихся микобактерий», «Роль трегалозы/трегалазы в реактивации покоящихся микобактерий»).

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

### ЛИТЕРАТУРА

1. Gutti, G., Arya, K., Singh, S.K. (2019) Latent tuberculosis infection (LTBI) and its potential targets: an investigation into dormant phase pathogens, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **19**, 1627–1642.
2. Lillebaek, T., Dirksen, A., Baess, I., Strunge, B., Thomsen, V.Ø., Andersen, A.B. (2002) Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection, *Journal of Infectious Diseases*, **185**, 401–404.
3. Ehlers, S. (2009) Lazy, dynamic or minimally recrudescence? On the elusive nature and location of the *Mycobacterium* responsible for latent tuberculosis, *Infection*, **37**, 87–95.
4. Patra, K., Batabyal, S., Mandal, K., Ghose, D., Sarkar, J. (2022) Tuberculosis and COVID-19: A combined global threat to human civilization, *Clinical Epidemiology and Global Health*, **15**, 101031.
5. Shleeva, M.O., Kaprelyants, A.S. (2023) Hypobiosis of *Mycobacteria*: Biochemical Aspects, *Biochemistry (Mosc)*, **88** (Suppl. 1), S52–S74.
6. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2003) Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy? *Advances in Microbial Physiology*, **47**, 65–129.
7. Nyström, T. (2001) Not quite dead enough: On bacterial life, culturability, senescence, and death, *Archives of Microbiology*, **176**, 159–164.
8. Calcott, P.H., Postgate, J.R. (1972) On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*, *Journal of General Microbiology*, **70**, 115–122.
9. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., Kell, D.B. (1998) A bacterial cytokine, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 8916–8921.
10. Biketov, S.F., Mukamolova, G.V., Potapov, V., Gilenkov, E., Vostroknutova, G.V., Kell, D.B., Young, M., Kaprelyants, A.S. (2000) Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **29**, 233–240.
11. Shleeva, M.O., Bagramyan, K., Telkov, M.V., Mukamolova, G.V., Young, M., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S. (2002) Formation and resuscitation of «non-culturable» cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase, *Microbiology*, **148**, 1581–1591.
12. 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*, **73**, 169–187.

13. Zhang, Y., Yang, Y., Woods, A., Cotter, R.J., Sun, Z. (2001) Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **284**, 542–547.
14. Kaprelyants, A., Kell, D. (1993) Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3187–3196.
15. Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Young, D.I., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2002) A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Microbiology*, **46**, 623–635.
16. Sparks, I.L., Derbyshire, K.M., Jacobs, W.R. Jr., Morita, Y.S. (2023) *Mycobacterium smegmatis*: the vanguard of mycobacterial research, *Journal of Bacteriology*, **205**, e0033722.
17. Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., Mizrahi, V. (2008) The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular Microbiology*, **67**, 672–684.
18. Wu, X., Yang, Y., Han, Y., Zhang, J., Liang, Y., Li, H., Li, B., Wang, L. (2008) Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 1121–1127.
19. Mukamolova, G.V., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G., Barer, M.R. (2010) Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **181**, 174–180.
20. Tufariello, J. M., Mi, K., Xu, J., Manabe, Y.C., Kesavan, A.K., Drumm, J., Tanaka, K., Jacobs, W.R. Jr., Chan, J. (2006) Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis, *Infection and Immunity*, **74** (5), 2985–2995.
21. Russell-Goldman E. Xu J, Wang X, Chan J, Tufariello JM. (2008) A *Mycobacterium tuberculosis* Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes, *Infection and Immunity*, **76**, 4269–4281.
22. Iona, E., Pardini, M., Mustazzolu, A., Piccaro, G., Nisini, R., Fattorini, L., Giannoni, F. (2016) *Mycobacterium tuberculosis* gene expression at different stages of hypoxia-induced dormancy and upon resuscitation, *Journal of Microbiology*, **54**, 565–572.
23. Salina, E.G., Waddell, S.J., Hoffmann, N., Rosenkrands, I., Butcher, P.D., Kaprelyants, A.S. (2014) Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states, *Open Biology*, **4**, 140106.
24. Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagn eris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., Keep, N.H. (2005) The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes, *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**, 270–273.
25. Ruggiero, A., Tizzano, B., Pedone, E., Pedone, C., Wilmanns, M., Berisio, R. (2009) Crystal structure of the resuscitationpromoting factor (DeltaDUF)RpfB from *M. tuberculosis*, *Molecular Biology*, **385**, 153–162.
26. Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M. (2006) Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation, *Molecular Microbiology*, **59**, 84–98.
27. Giebel, J.D., Carr, K.A., Anderson, E.C., Hanna, P.C. (2009) The germination-specific lytic enzymes SleB, CwlJ1, and CwlJ2 each contribute to *Bacillus anthracis* spore germination and virulence, *Journal of Bacteriology*, **191**, 5569–5576.



28. Heffron, J.D., Lambert, E.A., Sherry, N., Popham, D.L. (2010) Contributions of four cortex lytic enzymes to germination of *Bacillus anthracis* spores, *Journal of Bacteriology*, **192** (3), 763–770.
29. Haiser, H.J., Yousef, M.R., Elliot, M.A. (2009) Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*, *Journal of Bacteriology*, **191**, 6501–6512.
30. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Kaprelyants, A.S. (2011) Effect of secreted Rpf protein on intercellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures, *Microbiology*, **80**, 155–161.
31. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Kaprelyants, A.S. (2013) Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of «non-culturable» mycobacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **103**, 37–46.
32. Shleeva, M.O., Mukamolova, G.V., Young, M., Williams, H.D., 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.
33. Keep N.H., Ward, J.M., Cohen-Gonsaud, M., Henderson, B. (2006) Wake up ! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states, *Trends in Microbiology*, **14** (6), 271–276.
34. Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments, *Cell*, **135**, 486–496.
35. Dworkin, J., Shah, I.M. (2010) Exit from dormancy in microbial organisms, *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 890–896.
36. Kana, B.D., Mizrahi, V. (2010) Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **58**, 39–50.
37. Molle, V., Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way, *Molecular Microbiology*, **75**, 1064–1077.
38. Jones, G., Dyson, P. (2006) Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside, *Journal of Bacteriology*, **188**, 7470–7476.
39. Kang, C.M., Nyayapathy, S., Lee, J.Y., Suh, J.W., 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.
40. Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.J., 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 Pathogens*, **7**, e1002182.
41. Lee, M., Hesek, D., Shah, I.M., Oliver, A.G., Dworkin, J., Mobashery, S. (2010) Synthetic peptidoglycan motifs for germination of bacterial spores, *A European journal of chemical biology*, **11**, 2525–2529.
42. Squeglia, F., Ruggiero, A., Romano, M., Vitagliano, L., 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 Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **70**, 2295–2300.
43. Ruggiero, A., Squeglia, F., Pirone, L., Correale, S., Berisio, R. (2010) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the resuscitation promoting factor interacting protein RipA from *M. tuberculosis*, *Acta crystallographica section f: structural biology and crystallization communications*, **17**, 70–73.

44. Hett, E.C., Chao, M.C., Deng, L.L., Rubin, E.J. (2008) A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor, *PLoS Pathogens*, **4**, e1000001.
45. Hett, E.C., Chao, M.C., Steyn, A.J., Fortune, S.M., Deng, L.L., Rubin, E.J. (2007) A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Microbiology* **66**, 658–668.
46. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeва, M.O., Guryanova, S.V., Ruggiero, A., Berisio, R., Kaprelyants, A.S. (2015) A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria, *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, **282**, 2500–2511.
47. Hoeltje, J.V., Mirelman, D., Sharon, N., Schwarz, U. (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **124** (3), 1067–1076.
48. Shleeва, M., Goncharenko, A., Kudykina, Y., Young, D., Young, M., Kaprelyants, A. (2013) Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant mycobacteria by exogenous free fatty acids, *PLoS One*, **8**, e82914.
49. Daniel, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R., Kolattukudy, P.E. (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, *Journal of Bacteriology*, **186**, 5017–5030.
50. Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T.D., Kolattukudy, P.E. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages, *PLoS Pathogens*, **7**, e1002093.
51. Schaloske, R.H., Blaesus, D., Schlatterer, C., Lusche, D.F. (2007) Arachidonic acid is a chemoattractant for *Dictyostelium discoideum* cells, *Journal of Biosciences*, **32**, 1281–1289.
52. Downard, J., Toal, D. (1995) Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development, *Molecular Microbiology*, **16** (2), 171–175.
53. Kerwin, J.L. (1982) Chemical control of the germination of asexual spores of *Entornophthora culicis*, a fungus parasitic on dipterans, *Journal of General Microbiology*, **128**, 2179–2186.
54. Motaal, A.A., Tews, I., Schultz, J.E., Linder, J.U. (2006) Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, **273**, 4219–4228.
55. Raychaudhuri, S., Basu, M., Mandal, N.C. (1998) 1998) Glutamate and cyclic AMP regulate the expression of galactokinase in *Mycobacterium smegmatis*, *Microbiology*, **144** (8), 2131–2140.
56. Viridy, K., Sands, T.W., Kopko, S.H., van Es, S., Meima, M., Schaap, P., Cotter, D.A. (1999) High cAMP in spores of *Dictyostelium discoideum*: association with spore dormancy and inhibition of germination, *Microbiology*, **145**, 1883–1890.
57. Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., Thompson, C.J. (1998) Pleiotropi *Streptomyces coelicolor*, *Molecular Microbiology*, **30**, 33–46.
58. Gersch D., Römer W., Krügel H. (1979) Inverse regulation of spore germination and growth by cyclic AMP in *Streptomyces hygroscopicus*, *Experientia*, **35**, 749.
59. Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F., Rigali, S. (2004) Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*, *Journal of Bacteriology*, **186**, 1893–1897.
60. Busby, S., Kolb, A., Buc, H. (1995). The *E. coli* Cyclic AMP Receptor Protein. In: Eckstein, F., Lilley, D.M.J. (eds) *Nucleic Acids and Molecular Biology. Nucleic Acids and Molecular Biology*, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
61. Bai, G., Knapp, G.S., McDonough, K.A. (2011) Cyclic AMP signaling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency, *Cellular Microbiology*, **13** (3), 349–358.

62. Bai, G., Mccue, L.A., McDonough, K.A. (2005) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a Cyclic AMP Receptor Protein-Like DNA Binding Protein, *Journal of Bacteriology*, **187**, 7795–7804.
63. Rickman, L., Scott, C., Hunt, D.M., Hutchinson, T., Menéndez, M.C., Whalan, R., Hinds, J., Colston, M.J., Green, J., Buxton, R.S. (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, *Molecular Microbiology*, **56**, 1274–1286.
64. Pedroza-Roldán, C., Aceves-Sánchez Mde, J., Zaveri, A., Charles-Niño, C., Elizondo-Quiroga, D.E., Hernández-Gutiérrez, R., Allen, K., Visweswariah, S.S., Flores-Valdez, M.A. (2015) The adenylyl cyclase Rv2212 modifies the proteome and infectivity of *Mycobacterium bovis* BCG, *Folia Microbiologica*, **60**, 21–31.
65. Ganaie, A.A., Trivedi, G., Kaur, A., Jha, S.S., Anand, S., Rana, V., Singh, A., Kumar, S., Sharma, C. (2016) Interaction of Erp protein of *Mycobacterium tuberculosis* with Rv2212 enhances intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis*, *Journal of Bacteriology*, **198**, 2841–2852.
66. Shleeva, M.O., Kondratieva, T.K., Demina, G.R., Rubakova, E.I., Goncharenko, A.V., Apt, A.S., Kaprelyants, A.S. (2017) Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 gene confers improved fitness, accelerated recovery from dormancy and enhanced virulence in mice, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 1–8.
67. Shleeva, M.O., Kondratieva, T.K., Goncharenko, A.V., Apt, A.S., Kaprelyants, A.S. (2019) cAMP-dependent transcription factor in *Mycobacterium tuberculosis* coded by the Rv3676 gene as a possible target for the development of antituberculosis drugs, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **55**, 380–385.
68. Barer, M.R., Harwood, C.R. (1999) Bacterial viability and culturability, *Advances in Microbial Physiology*, **41**, 93–137.
69. Bai, G., Schaak, D.D., McDonough, K.A. (2009) cAMP levels within *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG increase upon infection of macrophages, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **55**, 68–73.
70. van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., Peters, P.J. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells, *Cell*, **129**, 1287–1298.
71. Rahman, A., Sobia, P., Gupta, N., Kaer, L.V., Das, G. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* subverts the TLR-2 – MyD88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol, *PLoS One*, **9**, e86886.
72. van Ingen, J., de Zwaan, R., Dekhuijzen, R., Boeree, M., van Soolingen, D. (2009) Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character, *Journal of Bacteriology*, **191**, 5865–5867.
73. Kalamidas, S.A., Kuehnel, M.P., Peyron, P., Rybin, V., Rauch, S., Kotoulas, O.B., Houslay, M., Hemmings, B.A., Gutierrez, M.G., Anes, E., Griffiths, G. (2006) cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria *Journal of Cell Science*, **119**, 3686–3694.
74. Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S., Bishai, W.R. (2009) Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylyl cyclase, *Nature*, **460**, 98–102.
75. Gazdik, M.A., McDonough, K.A. (2005) Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions, *Journal of Bacteriology*, **187**, 2681–2692.
76. Xu, H., Hegde, S.S., Blanchard, J.S. (2011) The reversible acetylation and inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* acetyl-CoA synthetase is dependent on cAMP, *Biochemistry*, **50**, 5883–5892.

77. Demina, G.R., Makarov, V.A., Nikitushkin, V.D., Ryabova, O.B., Vostroknutova, G.N., Salina, E.G., Shleeva, M.O., Goncharenko, A.V., Kaprelyants, A.S. (2009) Finding of the low molecular weight inhibitors of resuscitation promoting factor enzymatic and resuscitation activity, *PLoS One*, **4**, e8174.
78. Demina G.R., Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Riabova O.B., Lepioshkin A.Y., Makarov V.A., Kaprelyants A.S. (2017) Benzoylphenyl thiocyanates are new, effective inhibitors of the mycobacterial resuscitation promoting factor B protein, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **16**, 69.
79. Jungwirth, B., Emer, D., Brune, I., Hansmeier, N., Pühler, A., Eikmanns, B.J., Tauch, A. (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 Microbiology Letters*, **281**, 190–197.
80. Nikitushkin, V.D., Trenkamp, S., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Kaprelyants, A.S. (2020) Metabolic profiling of dormant *Mycolicobacterium smegmatis* cells' reactivation reveals a gradual assembly of metabolic processes, *Metabolomics*, **16**, 1–14.
81. Shleeva, M.O., Trutneva, K.A., Demina, G.R., Zinin, A.I., Sorokoumova, G.M., Laptinskaya, P.K., Shumkova, E.S., Kaprelyants, A.S. (2017) Free trehalose accumulation in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and its breakdown in early resuscitation phase, *Frontiers in Microbiology*, **8**:524.
82. Trutneva, K., Shleeva, M., Nikitushkin, V., Demina, G., Kaprelyants, A. (2018) Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology, *Frontiers in Microbiology*, **9**: 2083.
83. Trutneva, K.A., Shleeva, M.O., Demina, G.R., Vostroknutova, G.N., Kaprelyants, A.S. (2020) One-Year Old Dormant, «Non-culturable» *Mycobacterium tuberculosis* preserves significantly diverse protein profile, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 1–12.
84. Nikitushkin, V., Shleeva, M., Loginov, D., Dyčka, F.F., Sterba, J., Kaprelyants, A. (2022) Shotgun proteomic profiling of dormant, «non-culturable» *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One*, **17**, e0269847.
85. Li, H., Su, H., Kim, S.B., Chang, Y.K., Hong, S.K., Seo, Y.G, Kim, C.J. (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, *The Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**, 224–232.
86. Hey-Ferguson, A., Mitchell, M., Elbein, A.D. (1973) Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*, *Journal of Bacteriology*, **116**, 1084–1085.
87. Thevelein, J.M., den Hollander, J.A., 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 <sup>13</sup>C NMR, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 3503–3507.
88. Thevelein, J.M., Jones, K.A. (1983) Reversibility characteristics of glucose-induced trehalase activation associated with the breaking of dormancy in yeast ascospores, *European Journal of Biochemistry*, **136**, 583–387.
89. Thevelein, J.M. (1984) Regulation of trehalase mobilization in fungi, *Microbiology Reviews*, **48**, 42–59.
90. Ortiz, C.H., Maia, J.C., Tenan, M.N., Braz-Padrão, G.R., Mattoon, J.R., Panek, A.D. (1983) Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system, *Journal of Bacteriology*, **153**, 644–651.
91. McBride, M.J., Ensign, J.C. (1990) Regulation of trehalose metabolism by *Streptomyces griseus* spores, *Journal of Bacteriology*, **172**, 3637–3643.
92. Nikitushkin, V.D., Shleeva, M.O., Zinin, A.I., Trutneva, K.A., Ostrovsky, D.N., Kaprelyants, A.S. (2016) The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin, *FEMS Microbiology Letters*, **363**, 1–8.

93. Gligonov, I.A., Bagaeva, D.I., Demina, G.R., Vostroknutova, G.N., Vorozhtsov, D.S., Kaprelyants, A.S., Savitsky, A.P., Shleeva, M.O. (2024) The accumulation of methylated porphyrins in dormant cells of *Mycobacterium smegmatis* is accompanied by a decrease in membrane fluidity and an impede of the functioning of the respiratory chain, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, **1866**, 184270.
94. Budin, I., de Rond, T., Chen, Y., Chan, L.J.G., Petzold, C.J., Keasling, J.D. (2018) Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition, *Science*, **362**, 1186–1189.
95. Mykytczuk, N.C., Trevors, J.T., Leduc, L.G., Ferroni, G.D. (2007) Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **95**, 60–82.
96. Hazel, J.R. (1995) Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *The Annual Review of Physiology*, **57**, 19–42.
97. Dailey, H.A., Gerdes, S., Dailey, T.A., Burch, J.S., Phillips, J.D. (2015) Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 2210–2215.
98. Kundu, M., Basu, J. (2021) Applications of Transcriptomics and Proteomics for Understanding Dormancy and Resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis*, *Frontiers in Microbiology*, **12**, 1–16.
99. Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Gengenbacher, M., Mcewen, G., Mollenkopf, H.-J., Zamboni N., Kaufmann, S.H.E., Sauer, U. (2017) Integration of metabolomics and transcriptomics reveals a complex diet of *Mycobacterium tuberculosis* during early macrophage infection, *mSystems*, **2**, e00057.
100. Wayne, L.G., Hayes, L.G. (1996) An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence, *Infection and Immunity*, **64**, 2062–2069.
101. Wayne, L., Sohaskey, C. (2001) Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*, *The Annual Review of Microbiology*, **55**, 139–163.
102. Sherrid, A.M., Rustad, T.R., Cangelosi, G.A., Sherman, D.R., (2010) Characterization of a Clp protease gene regulator and the reoxygenation response in *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One*, **5**, e11622.
103. Salina, E.G., Grigorov, A.S., Bychenko, O.S., Skvortsova, Y.V., Mamedov, I.Z., Azhikina, T.L., Kaprelyants, A.S. (2019) Resuscitation of dormant «non-culturable» *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **9**, 272.
104. Schubert, O.T., Ludwig, C., Kogadeeva, M., Zimmermann, M., Rosenberger, G., Gengenbacher, M., Gillet, L.C., Collins, B.C., Röst, H.L., Kaufmann, S.H., Sauer, U., Aebersold, R. (2015) Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell Host & Microbe*, **18**, 1–13.
105. Madiraju, M.V., Moomey, M., Neuenschwander, P.F., Muniruzzaman, S., Yamamoto, K., Grimwade, J.E., Rajagopalan, M. (2006) The intrinsic ATPase activity of *Mycobacterium tuberculosis* DnaA promotes rapid oligomerization of DnaA on oriC, *Molecular Microbiology*, **59**, 1876–1890.
106. Hong, W., Deng, W., Xie, J. (2013) The Structure, Function, and Regulation of *Mycobacterium* FtsZ, *Cell Biochemistry and Biophysics*, **65**, 97–105.
107. Du, P., Sohaskey, C.D., Shi, L. (2016) Transcriptional and physiological changes during *Mycobacterium tuberculosis* reactivation from non-replicating persistence, *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1346.

108. Peterson, E.J.R., Abidi, A.A., Arrieta-Ortiz, M.L., Aguilar, B., Yurkovich, J.T., Kaur, A., Pan, M., Srinivas, V., Shmulevich, I., Baliga, N.S. (2020) Intricate Genetic Programs Controlling Dormancy in *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell Reports*, **31**, 107577.
109. Smollett, K.L., Smith, K.M., Kahramanoglou, C., Arnvig, K.B., Buxton, R.S., Davis, E.O. (2012) Global analysis of the regulon of the transcriptional repressor LexA, a key component of SOS response in *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of Biological Chemistry*, **287** (26), 22004–22014.
110. Gopinath, V., Raghunandan, S., Gomez, R.L., Jose, L., Surendran, A., Ramachandran, R., Pushparajan, A.R., Mundayoor, S., Jaleel, A., Kumar, R.A. (2015) Profiling the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy and reactivation, *Molecular & Cellular Proteomics*, **14**, 2160–2176.
111. Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling, *Molecular Microbiology*, **43**, 717–731.
112. Voskuil, M.I., Visconti, K.C., Schoolnik, G.K. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy, *Tuberculosis*, **84**, 218–227.
113. Nandi, M., Sikri, K., Chaudhary, N., Mande, S.C., Sharma, R.D., Tyagi, J.S. (2019) Multiple transcription factors co-regulate the *Mycobacterium tuberculosis* adaptation response to vitamin C, *BioMed Central Genomics*, **20**, 887.
114. McGillivray, A., Golden, N.A., Kaushal, D. (2015) The *Mycobacterium tuberculosis* Clp gene regulator is required for in vitro reactivation from hypoxia-induced dormancy, *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 2351–2367.
115. Raghunandan, S., Jose, L., Gopinath, V., Kumar, R.A. (2019) Comparative label-free lipidomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy and reactivation, *Scientific Reports*, **9**, 3660.
116. Choi, K.H., Kremer, L., Besra, G.S., Rock, C.O. (2000) Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (36), 28201–28207.
117. Vaubourgeix, J., Lin, G., Dhar, N., Chenouard, N., Jiang, X., Botella, H., Lupoli, T., Mariani, O., Yang, G., Ouerfelli, O., Unser, M., Schnappinger, D., McKinney, J., Nathan, C. (2015) Stressed mycobacteria use the chaperone ClpB to sequester irreversibly oxidized proteins asymmetrically within and between cells, *Cell Host & Microbe*, **17**, 178–190.
118. Abdallah, A.M., Verboom, T., Weerdenburg, E.M., Gey, van Pittius, N.C., Mahasha, P.W., Jiménez, C., Parra, M., Cadieux, N., Brennan, M.J., Appelmelk, B.J., Bitter, W. (2009) PPE and PE-PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5, *Molecular Microbiology*, **73**, 329–340.
119. D'Souza, C., Kishore, U., Tzolaki, A.G. (2023) The PE-PPE Family of *Mycobacterium tuberculosis*: Proteins in Disguise, *Immunobiology*, **228** (2), 152321.
120. Shah S., Briken, V. (2016) Modular organization of the ESX-5 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **6**, 49.
121. Kudykina, Y.K., Shleeva, M.O., Artsabanov, V.Y., Suzina, N.E., Kaprelyants, A.S. (2011) Generation of dormant forms by *Mycobacterium smegmatis* in the poststationary phase during gradual acidification of the medium, *Microbiology*, **80**, 638–649.
122. Dolan, S.K., Wijaya, A., Geddis, S.M., Spring, D.R., Silva-Rocha, R., Welch, M. (2018) Loving the poison: The methylcitrate cycle and bacterial pathogenesis, *Microbiology*, **164**, 251–259.