ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 6, с. 523–534

УДК 579.61

ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВЫЕ СИСТЕМЫ И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЕРСИСТЕНЦИЯ (ОБЗОР)

© 2019 г. М. В. Замахаев[1], А. В. Гончаренко[1], М. С. Шумков[1, *]

[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва 119071, Россия

**e-mail: shumkovm@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.12.2018 г.
После доработки 18.03.2019 г.
Принята к публикации 20.06.2019 г.

Персистенция представляет собой явление, при котором бактерии избегают летального действия антибиотиков за счет перехода в физиологическое состояние, определяющее невосприимчивость к антибактериальным препаратам. Среди факторов, обеспечивающих персистообразование, особое место занимают токсин-антитоксиновые системы, которые принимают участие в регуляции широкого спектра физиологических процессов и оказывают значительное влияние на исход антибиотикотерапии. В обзоре рассматриваются механизмы участия этих систем в образовании персистирующих форм бактерий, обсуждается клиническая значимость явления персистенции и способы борьбы с фенотипически толерантными клетками с позиций регуляции уровня активности токсин-антитоксиновых модулей.

Ключевые слова: персистенция, токсин-антитоксиновые системы, антибактериальные препараты, резистентность

DOI: 10.1134/S055510991906014X

Бактериальная персистенция. Одной из главных проблем современного здравоохранения являются все более частые случаи неудачной антибиотикотерапии. Наиболее очевидная причина этого заключается в том, что использование антибактериальных препаратов может быть скомпрометировано развитием бактериальной резистентности. Первые устойчивые к антибиотикам микроорганизмы были обнаружены уже в самом начале эры антибиотиков [1], а к настоящему времени известно, что бактерии способны развить устойчивость к большинству, если не ко всем, антибактериальным препаратам, используемым в клинике. Более того, слабо контролируемое применение антибиотиков среди населения, в сельском хозяйстве и медицинских учреждениях увеличивает скорость появления бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

Хотя генетически обусловленная резистентность к антибиотикам является основной, есть менее очевидные причины, по которым антибиотики могут не оказывать должного эффекта. Одна из них заключается в способности бактериальных клеток избегать летального действия антибиотиков за счет перехода в физиологическое состояние, в котором они оказываются невосприимчивы к антибактериальным препаратам. Это явление известно как бактериальная персистенция, и было впервые описано на культурах *Staphylococcus aureus* Джозефом Биггером [2].

Как правило, воздействие антибактериального препарата на изогенную культуру чувствительных к антибиотикам бактерий приводит к быстрой гибели значительной части популяции микроорганизмов. Однако часть клеток в присутствии антибиотика выживает, демонстрируя к нему временную толерантность [3]. При этом график гибели бактериальных клеток представляет собой характерную двухфазную кривую (рис. 1), отражающую быстрое падение числа КОЕ (чувствительные бактерии) сразу после добавки антибиотика и значительное замедление гибели спустя несколько часов (или суток, в зависимости от вида микроорганизмов) после его внесения (за счет субпопуляции клеток-персисторов).

На рис. 1 приведена двухфазная кривая, построенная на основе наших экспериментальных данных. Точками показаны средние ± средние квадратичные отклонения значений КОЕ. Построенная кривая (*1*) представляет собой результат проведенной по экспериментальным точкам степенной аппроксимации. В начальной фазе ее наклон отражает восприимчивость к антибиотику основной массы культуры – линейная кинетика

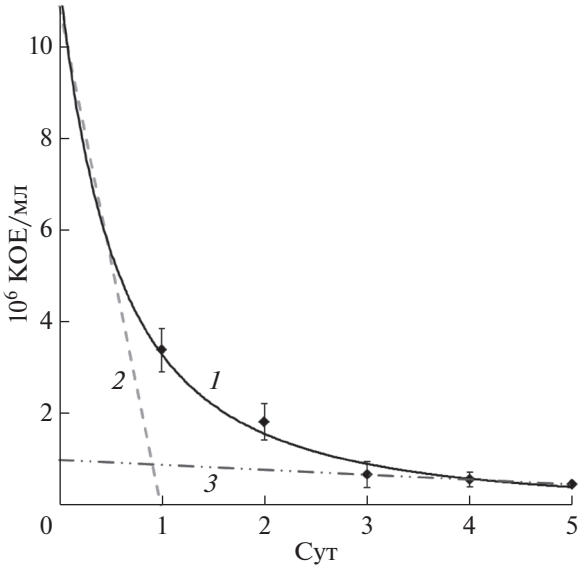

Рис. 1. Кинетика гибели клеток *M. smegmatis* MC^2155 при добавлении к растущей популяции генетически идентичных клеток 5 мкг/мл тетрациклина (2 МИК): *1* – двухфазная кривая гибели бактериальных клеток в присутствии антибиотика, *2*, *3* – линейная кинетика гибели популяции чувствительных к антибиотику клеток и персисторов вследствие их реактивации в присутствии антибиотика соответственно.

гибели популяции чувствительных к антибиотику клеток показана прямой (*2*). Наклон второй фазы инактивации демонстрирует существование субпопуляции персисторов, которая убывает с гораздо меньшей скоростью – линейная кинетика гибели персисторов вследствие их реактивации в присутствии антибиотика определяется кривой (*3*).

Продолжающееся, хотя и замедленное, падение числа КОЕ после нескольких часов воздействия антибиотика отражает возврат части клеток-персисторов в обычное активное состояние, в котором они становятся снова чувствительны к антибактериальному препарату. Это составляет ключевое отличие явления персистенции от устойчивости к антибиотикам: в отличие от резистентных мутантов персисторы не размножаются в присутствии бактерицидного агента, но могут возвращаться к исходному восприимчивому фенотипу. Если в среде в этот момент присутствует антибиотик, такие клетки гибнут. Если он отсутствует, они дают начало новой популяции бактерий, которая столь же чувствительна, как исходная, и в то же время аналогично ей продуцирует некоторую долю клеток-персисторов [4]. Следует подчеркнуть, что все эти физиологические изменения не сопровождаются изменением генотипа бактериальной клетки. Приобретенная физиологическая толерантность к неблагоприятному фактору не наследуется.

Наиболее часто используемым способом определения числа персисторов в культуре является оценка выживаемости клеток при действии антибактериального препарата [5]. В таких условиях выявляются клетки, невосприимчивые к конкретному антибиотику. В зависимости от особенностей физиологического состояния обнаруженные бактерии могут быть как нечувствительны, так и чувствительны к другим летальным факторам. С одной стороны, это позволяет говорить о гетерогенности субпопуляций персисторов (они включают в себя все многообразие бактерий, невосприимчивых к действию данного антибиотика вне зависимости от физиологических основ этой невосприимчивости), а с другой – предполагать существование субпопуляций бактерий, нечувствительных к широкому спектру антибактериальных препаратов [6]. В последнем случае речь идет, чаще всего, о медленно растущих (или покоящихся) бактериях. Они имеют низкую метаболическую активность и (частично или полностью) способны избегать действия большинства антибиотиков. Такое их свойство обусловлено направленностью действия антибиотиков на те или иные жизненно важные мишени. В медленно растущих клетках эти мишени малоактивны или недосягаемы для ингибирующего действия антибиотиков, что и определяет временную невосприимчивость бактерий к действию антибактериальных препаратов [7].

Первый "ген персистенции". Около 20 лет назад на волне усиления интереса к персистирующим формам бактерий исследователи задались вопросом, является ли появление в популяции таких клеток случайным [8] или представляет собой закономерный результат неких генетически обусловленных процессов [9]. Широкий спектр разнообразных результатов, полученных с тех пор, дает все больше оснований считать верной вторую точку зрения.

В 1980-х годах впервые были выделены мутанты *Escherichia coli*, которые воспроизводимо более интенсивно формировали персистирующие клетки [10]. Один из мутантных аллелей, *hipA7* (hip – high persistent), повышал выход нечувствительных к антибиотику клеток в 1000 раз [11], ярко демонстрируя возможность увеличения персистообразования в результате наследуемой мутации. При этом значительная часть популяции мутантных клеток оставалась чувствительной к антибактериальному препарату – возрастала не устойчивость популяции в целом, а лишь число персисторов.

Изучение механизма влияния HipA на частоту формирования персисторов привело к установлению факта, что этот белок представляет собой серин/треонин-киназу [12]. Путем фосфорилирования он инактивирует синтетазу глутамил-тРНК GltX [13, 14], что стимулирует накопление несвязанной $tRNA^{Glu}$ и синтез гуанозин тетрафосфата (**ppGpp**). Высокий уровень последнего, в свою

очередь, резко увеличивает уровень персистообразования [13].

Анализ структуры локуса, содержащего *hipA*, выявил, что этот ген входит в состав оперона, продукт второго гена которого, *hipB*, кодирует ауторепрессор транскрипции *hipBA* [15]. Помимо этого, белок HipB путем прямого взаимодействия ингибирует активность HipA, способного подавлять репликацию ДНК, а также процессы транскрипции и трансляции, что позволило предположить токсин-антитоксиновую природу локуса *hipBA* [16].

Токсин-антитоксиновые системы. Токсин-антитоксиновые (**ТА**) системы представляют собой генетические элементы, состоящие, как правило, из двух генов, один из которых кодирует стабильный токсин, а второй – лабильный антитоксин [17, 18]. В зависимости от природы антитоксина (является он белком или РНК) и способа его влияния на эффективность действия токсина (препятствует ли антитоксин синтезу токсина, блокирует ли его активность или защищает от действия токсина его мишень) выделяют 6 типов ТА-систем [19]. Наиболее распространенными являются ТА-системы II типа. В них как токсин, так и антитоксин являются белками, и антитоксин, помимо ингибирования активности токсина, одновременно участвует в регуляции экспрессии ТА-локуса. Именно эти ТА-системы чаще всего связаны с образованием персисторов [17, 20, 21].

Первоначально ТА-локусы были обнаружены в составе бактериальных плазмид [22, 23] и к настоящему времени хорошо известны как неотъемлемая часть мобилома, то есть совокупности генетических элементов, которые часто подвергаются горизонтальному переносу [24–26]. Позже выяснилось, что ТА-модули могут иметь также хромосомную локализацию. И хотя количество и состав хромосомных ТА-локусов сильно варьирует среди разных видов бактерий даже между близкородственными организмами, в хромосомах представлены ТА-локусы всех типов, а их распространенность не уступает встречаемости ТА-систем в плазмидах [25–29].

Так, *E. coli* K-12 MG1655 – основной модельный организм для значительной части исследований ТА-модулей – несет в хромосоме по меньшей мере 19 ТА-локусов I типа, 13 ТА-локусов II типа и 3 ТА-локуса IV типа. У *Salmonella enterica serovar Typhimurium* было обнаружено 6 хромосомальных ТА-локусов I типа и 21 ТА-локус II типа [30]. До настоящего времени не выявлено связи между спектром имеющихся ТА-модулей и особенностями биологии тех или иных изучаемых организмов. Однако предполагается, что большое число ТА-локусов способствует адаптации к неблагоприятным или быстро меняющимся условиям среды и создает дополнительные возможности для горизонтального переноса генов [26, 29].

Функции ТА-систем. *Пост-сегрегационный контроль.* Первоначально ТА-локусы рассматривались как “модули привыкания”, призванные предотвратить потерю бактериальными клетками кодирующих ТА-системы плазмид с помощью механизма, известного как *пост-сегрегационный контроль*. Этот механизм основан на различной стабильности антитоксина и токсина. В случае потери плазмиды клетки лишаются возможности непрерывно экспрессировать лабильные антитоксины, что приводит к их гибели и тем самым минимизирует вероятность появления бесплазмидных вариантов [31, 32].

К хорошо изученным примерам таких “модулей привыкания” относятся системы *hok/sok* плазмиды R1 (ТА-система I типа) и *ccdAB* F-плазмиды (ТА-система II типа) *E. coli* [22, 23]. Помимо них, известно участие в пост-сегрегационном контроле ТА-модулей *plDE* плазмиды RK2, *kis/kid* (ранее *pemIK*) плазмиды R1 и других [33–37].

Следует заметить, что пост-сегрегационный контроль не ограничивается исключительно плазмидами и действует аналогичным образом при стабилизации мобильных элементов и других генетически неустойчивых областей бактериальных хромосом [38, 39].

Абортивная инфекция. Другая четко установленная функция ТА-локусов – их участие в *абортивной инфекции*. Этим термином принято обозначать механизм “врожденного иммунитета” бактерий, который затрудняет распространение бактериофага в популяции посредством альтруистического самоубийства инфицированных клеток вследствие активации токсина токсин-антитоксиновой системы до начала репликации фага [40]. Так, было обнаружено, что ТА-локус *rnlAB E. coli* K-12 участвует в прерывании инфекции, вызванной бактериофагом T4 [41], а ТА-модули *mazEF* и *hoc/sok* плазмиды R1 значительно замедляют развитие T4-фаговой инфекции [42, 43]. Мощными средствами реализации абортивной инфекции являются также ТА-система *abiEi/ii* и родственный ей модуль *sanaTA* [35, 40, 44]. Описанная функция, по-видимому, является основной и для систем *toxIN* и *tenpIN*, которые препятствуют продуктивной фаговой инфекции у широкого спектра бактерий, включающего *Lactococcus lactis*, *Photorhabdus luminescens* и *E. coli* [25].

Тесные взаимодействия в системе “паразит-хозяин” нередко приводят к коэволюционным изменениям. И бактериофаги для борьбы с абортивной инфекцией выработали ряд механизмов, препятствующих индукции или адекватному функционированию ТА-модулей. Например, АДФ-рибозилтрансфераза Alt бактериофага T4 ингибирует токсин MazF *E. coli*, а его белок Dmd является первым примером антитоксина “расширенного спектра действия”, который может инактивиро-

вать сразу несколько различных токсинов этой бактерии [42, 45]. Бактериофаги также часто содержат специфические ингибиторы протеаз, которые могут препятствовать деградации белковых антитоксинов и, таким образом, предотвращать абортивную инфекцию, вызванную ТА-модулями II или IV типа [44].

Персистенция. С момента открытия *hipA* в качестве "гена персистенции" появились многочисленные подтверждения участия токсин-антитоксиновых локусов в формировании состояния фенотипической невосприимчивости бактерий к антибиотикам [46–50]. Показано, что эктопическая экспрессия токсинов II типа, эффективно ингибируя клеточный рост, одновременно переводит бактерии в состояние некультивируемости, из которого клетки могут быстро возвращаться к активному размножению при индукции соответствующих генов антитоксинов [51–53]. Участие ТА-систем в персистообразовании подтверждается высокой представленностью токсин-антитоксиновых мРНК во фракции персисторов, полученных на базе мутанта *hipA7* [47], а также значительным содержанием ТА-транскриптов в покоящихся клетках, собранных из растущей популяции *E. coli* дикого типа методом сортировки клеток [49].

Генетический анализ 11 известных ТА-систем II типа *E. coli* (все они, за исключением *hipBA*, содержат в качестве токсина рибонуклеазы) показал, что делеция любого из локусов незначительно влияет на уровень персистенции [47, 48, 54]. Однако делеция всех десяти ТА-локусов с рибонуклеазной активностью резко уменьшает уровень персистобразования, демонстрируя кумулятивное действие ТА-систем [48]. Математическое моделирование связи между ТА-локусами и персистентностью подтвердило эту интерпретацию [55]. Для ТА-систем I типа непосредственное влияние на формирование персистентных клеток *E. coli* отмечено лишь в одном случае [46].

Мишени ТА-систем, влияющие на образование персисторов. Установленное влияние ТА-модулей на формирование персисторов поставило вопрос о механизмах, посредством которых токсины изменяют частоту появления клеток, не чувствительных к антибиотикам. В настоящее время показано 8 таких механизмов, определяемых различными клеточными мишенями токсинов. Только один из них действует на уровне ДНК и связан с ингибированием ее репликации за счет влияния на ДНК-гиразу. Оставшиеся 7 приводят к подавлению трансляции, причем 5 связаны с расщеплением РНК (2 – мРНК, 2 – тРНК и 1 – рРНК): (1) расщепление мРНК, связанных с А-сайтом рибосомы, токсином RelE [56], (2) разрезание не связанных с рибосомой одноцепочечных мРНК при действии MazF, MqsR и HicA [52, 57, 58], (3) расщепление инициаторной $тРНК^{fMet}$ энтеробактериальным токсином VapC [59], (4) расщепление обычных тРНК микобактериальными VapC [60], (5) разрезание Сарцин-рициновой петли 23S рРНК за счет активности VapC20 и VapC23 *Mycobacterium tuberculosis* [61], фосфорилирование глутамил-тРНК синтетазы токсином HipA *E. coli* [13], (7) фосфорилирование фактора элонгации трансляции EF-Tu токсинами Doc профага P1 и *M. smegmatis* [62, 63] и (8) ингибирование ДНК-гиразы белками CcdB (гомологом Maz*F*) и ParE (гомологом RelE) [64, 65].

Механизмы формирования клеток-персисторов. *Стохастическое образование персистирующих клеток – стратегия минимизации риска*. Сохранение биологических систем на протяжении геологических эпох невозможно без формирования механизмов адаптации организмов к неблагоприятным воздействиям. Одним из способов, обеспечивающих выживание популяции в нестабильных условиях среды, является фенотипическое разнообразие, то есть возможность возникновения различных вариантов реализации генетической информации на уровне фенотипа [9]. Существование такой гетерогенности клеток в пределах генетически однородной бактериальной культуры часто рассматривается в качестве элемента "стратегии минимизации рисков" [66, 67]. При этом предполагается, что фенотипически резистентные клетки предсуществуют в культуре до того, как бактерии будут подвергнуты действию неблагоприятных факторов.

Вследствие низкого содержания персисторов в бактериальной популяции (обычно между 10^6 и 10^4 КОЕ/мл при общем количестве клеток в культуре около 10^8 КОЕ/мл) экспериментальная проверка этого предположения долгое время была практически невозможна. Впервые задача была решена только в 2004 г [68]. Используя флуоресцентную микроскопию в сочетании с методами микрогидродинамики, авторы оценили физиологические особенности отдельных клеток *hipA7* мутанта *E. coli* (который производит тысячекратно повышенный уровень персисторов) до, во время и после введения в среду ампициллина, а затем изучили потомство отдельных клеток-персисторов. Такой подход подтвердил первоначальную догадку [2], что персистирующие клетки представляют собой постоянно существующие субпопуляции, которые находятся в состоянии замедленного или остановленного метаболизма (это позволяет им сохранять толерантность к бактерицидному действию антибиотиков) [68]. Следовательно, возникает вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе данного процесса.

Известно, что жизнедеятельность бактерий тесно связана с воздействием внутреннего и внешнего "молекулярного шума", который представляет собой неупорядоченные колебания концентра-

ций различных молекул и оказывает влияние на уровень экспрессии генов в отдельных клетках [69]. Такой "шум" способен изменять фенотипическое разнообразие, если он затрагивает какие-либо регуляторные процессы и способствует возникновению положительной обратной связи [70]. Процесс "усиления шума" приводит к развитию состояния бистабильности (или метастабильности), то есть формированию двух (или более) устойчивых фенотипически различных субпопуляций клеток, которые сосуществуют в общей генетически идентичной популяции. Более того, гетерогенность может быть обнаружена и в пределах самих субпопуляций, что объясняет их способность проявлять антибиотико-специфичные разновидности персистенции.

Так, например, теоретический и экспериментальный анализ одиночных клеток *E. coli*, экспрессирующих *hipBA*, показал, что для индукции перехода в состояние покоя необходим определенный пороговый уровень концентрации HipA. Более того, время перехода клеток в состояние HipA-индуцированной персистенции пропорционально степени превышения порогового уровня этого белка [71].

Другим примером связи активности ТА-локусов с образованием персистирующих клеток является исследование систем *relBE* и *yefM/yoeB* у *E. coli* [72]. Использование генных слияний этих ТА-оперонов с *gfp* позволило установить, что транскрипция генов ТА-систем стохастически запускается на низком уровне уже в экспоненциально растущих клетках. При этом частота активации ТА-локусов оказывается сопоставимой с частотой образования персисторов. Методами микрогидродинамики было обнаружено, что клетки с активированной транскрипцией ТА-оперона прекращают размножение, демонстрируют толерантность к высоким дозам β-лактамов и способны возобновлять деление после удаления антибактериального препарата [72]. Таким образом, токсины ТА-систем действительно способны выступать в качестве эффекторов формирования состояния бактериальной персистенции.

Непосредственный механизм этого явления связывали с накоплением в отдельных клетках значительных концентраций (p)ppGpp. Считалось, что это происходит вследствие стохастической активации (p)ppGpp-синтезирующих ферментов RelA или SpoT и приводит к (p)ppGpp-зависимому ингибированию экзополифосфатазы PPX (клеточного фермента, который расщепляет полифосфаты), что обеспечивает накопление полифосфатов за счет конститутивной активности полифосфат-киназы (PPK). Повышенная концентрация полифосфатов в этом случае стимулирует Lon-протеиназу, расщепляющую антитоксины ТА-систем II типа [20], что приводит к увеличению относительного содержания токсинов, вызывает ингибирование трансляции и обеспечивает формирование персисторов [13, 48, 72].

Было высказано предположение [73], что в результате этих процессов может возникать петля положительной обратной связи, которая обеспечивает еще более выраженный синтез (p)ppGpp. Она могла бы проявляться в Lon-зависимой деградации антитоксина HipB ТА-пары HipBA, что позволило бы свободному HipA фосфорилировать глутамил-тРНК-синтетазу (GltX) и тем самым ингибировать связывание $tRNA^{Glu}$ с глутаминовой кислотой. В этом случае образующиеся несвязанные с аминокислотами тРНК входили бы в А-сайт рибосомы и усиливали RelA-зависимый синтез (p)ppGpp – положительная стимуляция RelA продуктом его работы (ppGpp) хорошо известна [74]. Такая положительная обратная связь поддерживала бы быстрое накопление (p)ppGpp, что, приводило бы к снижению скорости транскрипции и трансляции, повышало концентрацию полифосфатов и, как следствие, активность Lon-протеиназы, приводя, в конечном итоге, к активации токсинов и образованию клеток-персисторов. Однако это предположение не было подтверждено экспериментально. Штамм с делецией локуса *hipBA* не проявил пониженного уровня персистообразования [75–77], в связи с чем существование такой петли обратной связи в настоящее время остается не доказанным.

Относительно недавно обнаружилось, что описанное участие полифосфатов в формировании персисторов и объединение (p)ppGpp, полифосфатов, Lon-протеиназы и ТА-модулей в единый путь регуляции персистообразования было выявлено вследствие неадекватности использованных бактериальных штаммов [78]. Помимо этого, сами авторы опровергли данные о постепенном снижении частоты появления персисторов по мере удаления 10 ТА-локусов в хромосоме *E. coli* [79]. Отсутствие различий частот персистообразования в независимо сконструированном делеционном мутанте по 10 ТА-локусам в сравнении с клетками *E. coli* дикого типа было также подтверждено в работе конкурирующей группы исследователей [80]. Вместе с тем, утверждение о резком повышении числа персисторов в условиях сверхэкспрессии генов токсинов остается по-прежнему в силе [47, 50, 79, 81], хотя однозначно говорить, что в этом случае именно повышенный уровень токсина запускает процесс формирования фенотипической резистентности пока еще рано [82].

Следует отметить, что в случае описанного выше (p)ppGpp-зависимого механизма для формирования персисторов не требуется каких-либо участников извне, что позволяет предположить исключительно стохастический характер этого процесса.

Вместе с тем, не исключено участие в образовании персисторов и факторов окружающей среды.

Индукция бактериальной персистенции внешними факторами. Известно, что доля персисторов в культурах бактерий существенно возрастает по мере увеличения плотности культуры [4, 72]. В стационарной фазе, когда культура перестает расти, или при выращивании в биопленке, по меньшей мере, 1% бактериальных клеток становятся не чувствительны к антибиотикам. Показано увеличение уровня персистообразования при ограничении концентрации в среде питательных веществ или между циклами роста в процессе диауксического перехода [4, 83–87]. Предварительная обработка субингибиторными концентрациями антибиотиков, окислительный стресс, тепловой шок или введение повреждающих ДНК соединений также повышают устойчивость клеток к антибиотикам в ходе адаптивного ответа бактерий [46, 86, 88–90].

Все эти факты свидетельствуют в пользу возможности индукции состояния персистенции под действием внешних факторов. То есть персистирующие клетки могут возникать в бактериальных культурах не только стохастически в условиях отсутствия стресса в ходе реализации стратегии минимизации рисков, но и (1) вследствие влияния неблагоприятных изменений окружающей среды (голодание, окислительный и кислотный стресс, тепловой шок, ограничение питания и гетерогенность условий в биопленках), (2) в ходе межклеточных взаимодействий, например, при действии молекул чувства кворума (quorum sensing, QS) или (3) при взаимодействии “патоген-хозяин”.

Стрессовые воздействия. При обсуждении механизма влияния на образование персисторов голодания или иных видов стрессовых воздействий возникает вопрос о роли в этих процессах уже упоминавшегося тетрагуанидинфосфата ((p)ppGpp) – универсальной сигнальной молекулы, участвующей в формировании стрессового ответа, и активирующейся практически у всех видов бактерий в ответ на множество различных неблагоприятных воздействий. Его эффект выражается в перенаправлении клеточного метаболизма, замедлении роста культуры и регуляции экспрессии (в случае *E. coli*) около 500 генов [91, 92]. Связываясь с РНК-полимеразой, (p)ppGpp обеспечивает ингибирование промоторов генов стабильных РНК (рРНК и тРНК) и активирует экспрессию генов биосинтеза аминокислот и накопление RpoS (основного регулятора общего стрессового ответа). Описанные изменения характерны не только для строгого (stringent) ответа, развивающегося в случае аминокислотного голодания, но возникают также при переходе бактериальной культуры в стационарную фазу, необходимы для выживания бактерий в целом и проявления ими свойств вирулентности [93].

В пользу участия (p)ppGpp в персистообразовании свидетельствует резко выраженное снижение числа клеток-персисторов в экспоненциально растущих культурах *E. coli* с удаленными генами *relA* и *spoT* (кодирующими синтазы (p)ppGpp I и II типов) [16, 72]. Также показана необходимость присутствия базовых уровней (p)ppGpp для поддержания толерантности к действию антибиотиков грамположительных патогенных бактерий *E. faecalis* и *S. aureus* [94, 95].

Пониженная чувствительность к антибиотикам *P. aeruginosa* и *E. coli*, выращенных в биопленках, также зависит от (p)ppGpp [72, 84, 87]. Это связано с трехмерностью структуры биопленок и многослойным распределением в них бактерий, что обусловливает ограниченный доступ к питательным веществам для значительного числа клеток и, как следствие, индуцирует развитие стрессового ответа на голодание. Важно отметить, что в биопленках *E. coli*, не способных активировать стрессовый ответ без полифосфатов, Lon-протеиназы или ТА-систем, голодание не приводит к образованию персисторов [72].

С формированием персистирующих клеток связана и активация SOS-системы репарации ДНК. Мутанты *E. coli* с дефектами генов SOS-системы (*lexA*, *recA* или *recB*) демонстрируют пониженные уровни персистообразования при воздействии фторхинолонов [96], а ее индукция, напротив, усиливает невосприимчивость клеток к антибиотикам этой группы. Важно, что этот эффект зависит не столько от непосредственной активности системы репарации, “залечивающей” разрывы ДНК, вызванные действием фторхинолонов, сколько от индуцируемого повреждениями ДНК токсина TisB [46]. Этот небольшой полипептид (29 аминокислотных остатков) ассоциируется с клеточной мембраной и снижает величину электрохимического протонного градиента и, как следствие, уровень АТФ [97]. В конечном итоге это, прямо или косвенно, обеспечивает возникновение TisB-зависимой множественной лекарственной устойчивости.

Межклеточные взаимодействия бактерий. Межклеточные взаимодействия в популяциях бактерий способствуют появлению фенотипической гетерогенности, по-видимому, преимущественно путем передачи химических сигналов в рамках феномена, известного как чувство кворума [98]. Подтверждением этому, например, служит выраженное увеличение доли персисторов в бактериальной культуре к концу экспоненциальной фазы периодического культивирования, что в точности напоминает динамику реакции на молекулы QS [3, 4]. Аналогично, значительное увеличение числа персисторов наблюдается при до-

бавлении супернатанта стационарных культур к растущей культуре *P. aeruginosa* [88]. В случае *E. coli* или *S. aureus* такой подход не вызывает повышения уровня персистообразования, что объясняется регуляторными эффектами выделяемых *P. aeruginosa* и нехарактерных для *E. coli* или *S. aureus* сигнальных молекул QS пиоцианина и ацилгомосеринлактона [88]. Помимо этого, известно участие стресс-индуцибельного феромонового пептида CSP, являющегося молекулой QS, в генерации клеток-персистеров *Streptococcus mutans* [86].

Не так давно было показано влияние индола, синтезируемого в условиях роста при ограниченном содержании в среде питательных веществ, в качестве фактора, повышающего вероятность перехода клеток *E. coli* в состояние персистенции [94]. Позже появились указания, что индол, напротив, снижает эффективность образования персистеров этого вида [99, 100]. Причины такого противоречия и истинную роль индола в персистообразовании еще предстоит установить. Однако следует заметить, что это соединение представляет собой один из немногочисленных, по-видимому, химических сигналов, которые способны оказывать влияние на формирование фенотипически резистентных форм бактерий на межвидовом уровне, индуцируя запуск стратегии минимизации рисков клетками бактерий, в норме не способных к его синтезу. Основанием для такого утверждения служит обнаруженное влияние индола на образование персистеров в культуре *Salmonella typhimurium*, которая его, как правило, не производит [101].

Взаимодействия "патоген-хозяин". При патогенезе в макроорганизме бактерии сталкиваются с различными стрессовыми воздействиями, способными приводить к формированию персистеров. Так, микроскопия единичных клеток *S. typhimurium* показала, что в условиях фагоцитоза макрофагами некоторые бактерии продолжают делиться, в то время как другие (даже в пределах одного макрофага) переходят в нерепликативное состояние [102]. Часть обнаруживаемых неделящихся клеток при этом находится в состоянии, подобном персистенции, что позволяет им в течение длительного времени переживать как неблагоприятные воздействия со стороны организма хозяина, так и влияние антибиотиков [103].

Другой пример – формирование персистеров клетками сальмонелл, попавших в вакуоли макрофагов, в которых они сталкиваются с кислой реакцией среды и ограниченным содержанием питательных веществ [104]. Мутанты *Salmonella* с нарушениями механизмов формирования стрессового ответа демонстрируют значительно сниженные уровни персистообразования при попадании в макрофаги. При этом на образование персистеров оказывают влияние присутствие Lon-протеазы и активность ТА-систем [103]. Эти наблюдения, по-видимому, свидетельствуют об участии в формировании персистеров *S. typhimurium* механизма, сходного с таковым (пока неподтвержденным) экспоненциально растущих культур *E. coli* [72], с той лишь разницей, что Lon-зависимый путь индукции персистообразования у *Salmonella* запускается в ответ на специфические сигналы, исходящие от клеток организма-хозяина [103].

Реактивация персистирующих форм бактерий. Чтобы дать начало новой бактериальной популяции, клетки-персистеры должны иметь возможность возобновить размножение. Эффективность перехода персистеров в активное состояние (реактивация) определяется по наклону кривой во второй фазе классического графика выживания бактерий при действии антибиотика, показанного на рис. 1. Скорость реактивации теоретически совпадает со скоростью гибели бактериальных клеток, так как персистеры, переходящие к активному росту в присутствии антибиотика, погибают. Поскольку скорость гибели постоянна, предполагалось, что реактивация происходит также с неизменной скоростью, как правило, случайным образом, и определяется стохастическими процессами [71].

Хотя в последнее время появляются данные в пользу гипотезы о неслучайной реактивации бактерий из состояния персистенции и зависимости этого процесса от активности рибосом [105], молекулярные механизмы реактивации бактерий из персистирующего состояния по-прежнему известны мало, что обусловлено преимущественно отсутствием эффективных экспериментальных подходов к их изучению. Можно только предполагать, что именно происходит при возвращении клеток к активному росту.

Так, например, известно, что скорость трансляции в клетках персистеров относительно низка. Низкий уровень общей трансляции обеспечивает медленный синтез белков ТА-систем. Поскольку антитоксины (**A**) менее стабильны, чем токсины (**T**), то в персистерах поддерживается высокое T/A-соотношение. В свою очередь, такое соотношение T/A способствует активации экспрессии ТА-оперона вследствие явления обусловленной кооперативности [106, 107] и обеспечивает поддержание синтеза токсинов в персистерах. Математическое моделирование показало, что обусловленная кооперативность также может приводить к быстрому снижению активности токсина, когда сигнал, который вызывает расщепление антитоксина (высокий уровень (p)ppGpp или полифосфатов) [106, 107], ослабевает. Нейтрализованный токсин уже не может обеспечивать сниженный уровень метаболической активности и рост культуры возобновляется. Ингибирование синтеза Lon-

протеиназы, полифосфатов или (p)ppGpp, по-видимому, также может ускорить реактивацию. В целом, изучение механизмов перехода клеток из состояния персистенции к активному росту чрезвычайно важно для разработки стратегий борьбы с персистообразованием и заслуживает самого пристального внимания.

Клиническая значимость клеток-персистеров. Поскольку персистирующие формы могут образовываться у многих видов патогенных бактерий, таких как *E. coli*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* и грибов, например, *Candida albicans* [108], считается, что явление персистенции вносит значительный вклад в повышение вероятности неблагоприятного исхода лечения инфекционных заболеваний антибиотиками. Математическое моделирование процесса лечения бактериальной инфекции действительно предсказало, что клетки-персисторы (1) увеличивают время, за которое антибиотики полностью убивают популяцию патогенных бактерий, и (2) исключают полное искоренение инфекции [109]. Экспериментальные работы продемонстрировали, что регулярное применение высоких доз бактерицидных антибиотиков к популяции мутагенизированных клеток *E. coli* приводит к образованию мутантов по ТА-локусу *hip*, которые стабильно дают повышенный уровень персисторов [10]. Повторяющееся введение высоких доз антибиотиков является стандартным приемом, применяемым для лечения хронических инфекций. В связи с этим предполагается, что *hip*-мутанты способны обеспечить патогенным микроорганизмам селективное преимущество и стать причиной появления осложнений в процессе борьбы с инфекциями. Такие мутанты действительно были получены *in vivo* в ходе терапии заболеваний, вызванных *C. albicans* [110] и *P. aeruginosa* [111]. Идея об участии феномена персистенции в хронизации инфекций получила свое подтверждение. Более того, возникло предположение, что персисторы могут способствовать развитию наследуемой генетической устойчивости к антибиотикам. Важный для их формирования путь стрессового ответа может ускорить образование спонтанных мутаций или активировать горизонтальный перенос генов, что будет способствовать возникновению антибиотикорезистентных мутантов [112, 113].

ТА-модули и борьба с бактериальной персистенцией. По мере расширения наших представлений о механизмах формирования персисторов, появляется все больше возможностей разработки новых способов борьбы с такими клетками. Как правило, персисторы медленно растут или находятся в состоянии покоя, то есть функционально изолированы от остальной популяции. В связи с этим, необходимо либо минимизировать гетерогенность, стимулируя реактивацию покоящихся клеток и тем самым получая гомогенную восприимчивую к антибиотикам бактериальную популяцию, либо использовать антибактериальные соединения, которые повреждают внутриклеточные мишени не только в растущих, но и покоящихся клетках.

В первом случае добиться желаемого результата можно было бы, например, за счет управления активностью компонентов ТА-систем при помощи антисмысловых РНК. Направленное изменение Т/А-соотношения будет предотвращать образование персистирующих клеток или способствовать их реактивации. Помимо этого, нарушение баланса компонентов ТА-систем может дать возможность запустить процесс программируемой клеточной смерти бактерий, а принципы работы токсинов – стать основой для создания новых антибактериальных препаратов. Так, изучение токсина CcdB, который нарушает функции ДНК-гиразы, что приводит к фрагментации ДНК и гибели клеток *E. coli*, позволило синтезировать пептид, который ингибирует этот фермент (и другие топоизомеразы), что приводит к гибели бактерий [114]. В ТА-системе ω-ε-ζ токсин ζ показал способность фосфорилировать предшественник пептидогликана уридин-N-ацетилглюкозамин, что также приводило к конкурентному ингибированию белка MurA, который играет важную роль в биосинтезе пептидогликана [115]. Было описано, что ферментативный продукт токсина ζ уридин-N-ацетилглюкозамин-3-фосфат является потенциальной основой для разработки нового класса антибиотиков широкого спектра действия [115].

Поскольку значимую роль в развитии персистенции и вирулентности играет стрессовый ответ [116] (в том числе, за счет активации ТА-систем), ингибирование его компонентов также способно привести к терапевтическому эффекту. В настоящее время уже начался поиск таких потенциальных ингибиторов. Например, были разработаны синтетические аналоги ppGpp, которые эффективно подавляют синтетазную активность белков Rel и тем самым предотвращают долгосрочное выживание грамположительных бактерий [117].

Описывая использование антибактериальных соединений, которые повреждают внутриклеточные мишени не только в растущих, но и в покоящихся клетках, стоит упомянуть о ацилдепсипептидах. Они представляют собой класс антибактериальных соединений, которые активируют ключевой фермент универсального бактериального протеазного комплекса ClpP [118]. Ацилдепсипептиды связываются с этим белком и запускают каскад нерегулируемой летальной деградации белков. Предполагалось, что активный протеолиз должен привести, в том числе, и к росту соотношения Т/А, что в случае повышения относительной концентрации летальных токсинов может приводить к гибели клеток, которые по каким-либо причинам

смогли пережить действие протеазы. Помимо этого, такой протеолитический каскад вполне может быть летальным и для покоящихся бактерий. Эта гипотеза была проверена [119], и удалось установить, что один из ацилдепсипептидов (ADEP4) способен приводить к полному уничтожению биопленок *S. aureus in vitro*. При одновременном применении с обычными антибиотиками ADEP4 оказался способен уничтожать труднодоступную инфекционную биопленку в организме мыши, вызванную *S. aureus* [119]. Однако неизвестно, были ли в процессах гибели от ADEP4 задействованы какие-либо ТА-системы.

Проведенные к настоящему времени многочисленные и разнообразные исследования бактериальной персистенции показали, что в основе этого явления лежит множество различных механизмов, и персисторы, толерантные к действию антибиотиков, могут возникать в результате действия самых разных факторов. Тем не менее, глубокая вовлеченность в персистообразование путей стрессового ответа предполагает, что формирование фенотипически толерантных к действию антибиотиков клеток представляет собой сформировавшуюся в процессе эволюции стратегию минимизации рисков, используемую бактериями, чтобы выживать в быстро меняющихся и потенциально смертельных условиях окружающей среды. До настоящего времени большинство работ было сосредоточено на изучении механизмов невосприимчивости к антибиотикам. Однако персисторы также могут переживать действие ионов тяжелых металлов [120] и, возможно, некоторых других неблагоприятных воздействий, таких как высокая осмолярность, тепловой шок или экстремальные значения pH.

Гетерогенность бактериальных популяций и временный, ненаследуемый характер состояния перситенции бактериальных клеток существенно осложняют изучение этого явления, поскольку возникает необходимость применения сложных методик, направленных на изучение транскриптомов и метаболомов отдельно взятых клеток в конкретный момент времени. И хотя персисторы принципиально отличаются от генетически резистентных клеток, рассмотренные в обзоре механизмы их формирования способны существенно повысить вероятность появления трудноизлечимых и хронических инфекций и могут приводить к развитию полноценной генетически обусловленной резистентности.

Изучение фенотипической невосприимчивости бактерий к антибиотикам может помочь в решении и других медицинских проблем. Например, подобно бактериям, гетерогенность демонстрируют раковые клетки. Известны их субпопуляции, которые медленно растут, обладают устойчивостью к лекарственным препаратам и могут вернуться к злокачественному росту и неконтролируемому делению после завершения терапии [121].

В результате тридцати лет изучения роли бактериальных ТА-систем было показано участие этих модулей в широком спектре физиологических процессов у бактерий, что заложило основы более широкого понимания молекулярных механизмов стрессового ответа, индукции состояния персистенции и образования биопленок. Стало ясно, что ТА-системы контролируют механизмы, которые оказывают значительное влияние на исход лечения антибиотиками. Раскрытие фундаментальных физиологических механизмов функционирования ТА-пар привело к новым биотехнологическим и медицинским разработкам, в том числе, к созданию новых классов антибактериальных веществ. Тем не менее, ученые еще не научились полноценно предотвращать появление персистирующих бактерий или принудительно возвращать их к активному росту, эффективно манипулировать внутриклеточным уровнем токсинов и т.д., поэтому дальнейшее изучение ТА-систем является одной из ключевых задач современной (в том числе, медицинской) микробиологии и нуждается в самом пристальном внимании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abraham E.P., Chain E.* // Nature. 1940. V. 146. № 3713. P. 837–837.
2. *Bigger J.W.* // Lancet. 1944. V. 2. № 6320. P. 497–500.
3. *Lewis K.* // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. № 1. P. 357–372.
4. *Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K.* // FEMS Microbiol. Lett. V. 230. № 1. P. 13–18.
5. *Michiels J., Fauvart M.* Bacterial persisters: Methods and Protocols / Ed. J.M. Walker. Heverlee: Humana Press, 2016. 241 p.
6. *Hofsteenge N., Van Nimwegen E., Silander O.K.* // BMC microbiology. 2013. V. 13. № 25. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-25
7. *Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K.* //Science. 2016. V. 354. № 6318. https://doi.org/10.1126/science.aaf4268
8. *Nyström T.* // Mol. Microbiol. 2003. V. 48. № 1. P. 17–23.
9. *Kussell E., Leibler S.* // Science. 2005. V. 309. № 5743. P. 2075–2078.
10. *Moyed H.S., Bertrand K.P.* // J. Bacteriol. 1983. V. 155. № 2. P. 768–775.
11. *Wolfson J.S., Hooper D.C., McHugh G.L., Bozza M.A., Swartz M.N.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1990. V. 34. № 10. P. 1938–1943.
12. *Correia F.F., D'Onofrio A., Rejtar T., Li L., Karger B.L., Makarova K., Koonin E.V., Lewis K.* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 24. P. 8360–8367.
13. *Germain E., Castro-Roa D., Zenkin N., Gerdes K.* // Mol. Cell. 2013. V. 52. № 2. P. 248–254.
14. *Kaspy I., Rotem E., Weiss N., Ronin I., Balaban N.Q., Glaser G.* // Nature communications. 2013. V. 4. № 1. P. 3001. https://doi.org/10.1038/ncomms4001

15. *Black D.S., Kelly A.J., Mardis M.J., Moyed H.S.* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 18. P. 5732–5739.
16. *Korch S.B., Henderson T.A., Hill T.M.* // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 4. P. 1199–1213.
17. *Van Melderen L.* // Curr. Opin. Microbiol. 2010. V. 13. № 6. P. 781–785.
18. *Wang X., Wood T.K.* // Appl Environ Microbiol. 2011. V. 77. № 16. P. 5577–5583.
19. *Page R., Peti W.* // Nat. Chem. Biol. 2016. V. 12. № 4. P. 208–214.
20. *Gerdes K., Maisonneuve E.* // Annu. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. № 1. P. 103–123.
21. *Loris R., Garcia-Pino A.* // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 13. P. 6933–6947.
22. *Gerdes K., Rasmussen P.B., Molin S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986b. V. 83. № 10. P. 3116–3120.
23. *Ogura T., Hiraga S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 4784–4788.
24. *Blower T.R., Short F.L., Rao F., Mizuguchi K., Pei X.Y., Fineran P.C., Luisi* // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 13. P. 6158–6173.
25. *Goeders N., Chai R., Chen B., Day A., Salmond G.P.* // Toxins (Basel). 2016. V. 8. № 10. E282. https://doi.org/10.3390/toxins8100282
26. *Leplae R., Geeraerts D., Hallez R., Guglielmini J., Drèze P., Van Melderen L.* // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 13. P. 5513–5525.
27. *Coray D.S., Wheeler N.E., Heinemann J.A., Gardner P.P.* // RNA Biol. 2011. V. 14. № 3. P. 275–280.
28. *Fozo E.M., Makarova K.S., Shabalina S.A., Yutin N., Koonin E.V., Storz* // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. № 11. P. 3743–3759.
29. *Pandey D.P., Gerdes K.* // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 3. P. 966–976.
30. *Lobato-Marquez D., Moreno-Cordoba I., Figueroa V., Diaz-Orejas R., Garcia-del Portillo F.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 9374.
31. *Jensen R.B., Gerdes K.* // Mol. Microbiol. 1995. V. 17. № 2. P. 205–210.
32. *Van Melderen L., Bernard P., Couturier M.* // Mol. Microbiol. 1994. V. 11. № 6. P. 1151–1157.
33. *Roberts R.C., Ström A.R., Helinski D.R.* // J. Mol. Biol. V. 1994. V. 237. № 1. P. 35–51.
34. *Tsuchimoto S., Ohtsubo H., Ohtsubo E.* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 4. P. 1461–1466.
35. *Dy R.L., Przybilski R., Semeijn K., Salmond G.P., Fineran P.C.* // Nucleic Acids Res. 2014a. V. 42. № 7. P. 4590–4605.
36. *Rao F., Short F.L., Voss J.E., Blower T.R., Orme A.L., Whittaker T.E., Luisi B.F., Salmond G.P.* // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. № 19. P. 9529–9540.
37. *Short F.L., Pei X.Y., Blower T.R., Ong S.L., Fineran P.C., Luisi B.F., Salmond G.P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 110. № 3. P. 241–249.
38. *Szekeres S., Dauti M., Wilde C., Mazel D., Rowe-Magnus D.A.* // Mol. Microbiol. 2007. V. 63. № 6. P. 1588–1605.
39. *Wozniak R.A., Waldor M.K.* // PLoS Genet. 2007. V. 5. № 3. e1000439.
40. *Dy R.L., Richter C., Salmond G.P., Fineran P.C.* // Annu. Rev. Virol. 2014b. V. 1. № 1. P. 307–331.
41. *Koga M., Otsuka Y., Lemire S., Yonesaki T.* // Genetics. 2011. V. 187. № 1. P. 123–130.
42. *Alawneh A.M., Qi D., Yonesaki T., Otsuka Y.* // Mol. Microbiol. 2016. V. 99. № 1. P. 188–198.
43. *Pecota D.C., Wood T.K.* // J. Bacteriol. 2016. V. 178. № 7. P. 2044–2050.
44. *Sberro H., Leavitt A., Kiro R., Koh E., Peleg Y., Qimron U., Sorek R.* // Mol. Cell. 2013. V. 50. № 1. P. 136–148.
45. *Otsuka Y., Yonesaki T.* // Mol. Microbiol. 2012. V. 83. № 4. P. 669–681.
46. *Dörr T., Vulic M., Lewis K.* // PLoS Biol. 2010. V. 8. № 2. P. e1000317.
47. *Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K.* // J. Bacteriol. 2004b. V. 186. № 24. P. 8172–8180.
48. *Maisonneuve E., Shakespeare L.J., Jørgensen M.G., Gerdes K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 32. P. 13206–13211.
49. *Shah D., Zhang Z.G., Khodursky A., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K.* // BMC Microbiol. 2006. V. 6. № 53. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-53
50. *Vazquez-Laslop N., Lee H., Neyfakh A.A.* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 10. P. 3494–3497.
51. *Christensen-Dalsgaard M., Gerdes K.* // Mol. Microbiol. 2006. V. 62. № 2. P. 397–411.
52. *Christensen-Dalsgaard M., Jørgensen M.G., Gerdes K.* // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. № 2. P. 333–348.
53. *Pedersen K., Christensen S.K., Gerdes K.* // Mol. Microbiol. 2002. V. 45. № 2. P. 501–510.
54. *Kim Y., Wood T.K.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 391. № 1. P. 209–213.
55. *Fasani R.A., Savageau M.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 27. P. 2528–2537.
56. *Christensen S.K., Gerdes K.* // Mol. Microbiol. 2003. V. 8. № 5. P. 1389–1400.
57. *Jørgensen M.G., Pandey D.P., Jaskolska M., Gerdes K.* // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 4. P. 1191–1199.
58. *Zhang Y., Zhang J., Hoeflich K.P., Ikura M., Qing G., Inouye M.* // Mol. Cell. 2003. V. 12. № 4. P. 913–923.
59. *Winther K.S., Gerdes K.* // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 2011. V. 108. № 18. P. 7403–7407.
60. *Winther K., Tree J.J., Tollervey D., Gerdes K.* // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 20. P. 9860–9871.
61. *Winther K.S., Brodersen D.E., Brown A.K., Gerdes K.* // Nat. Commun. 2013. V. 4. № 2796. https://doi.org/10.1038/ncomms3796
62. *Castro-Roa D., Garcia-Pino A., De Gieter S., van Nuland N.A., Loris R., Zenkin N.* // Nat. Chem. Biol. 2013. V. 9. № 12. P. 811–817.
63. *Cruz J.W., Rothenbacher F.P., Maehigashi T., Lane W.S., Dunham C.M., Woychik N.A.* // The J. biological chemistry. 2014. V. 289. № 11. P. 7788–98.
64. *Bernard P., Couturier M.* // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. № 3. P. 735–745.
65. *Jiang Y., Pogliano J., Helinski D.R., Konieczny I.* // Mol. Microbiol. 2002. V. 44. № 4. P. 971–979.
66. *Dubnau D., Losick R.* // Mol. Microbiol. 2006. V. 61. № 3. P. 564–572.
67. *Veening J.W., Smits W.K., Kuipers O.P.* // Annu. Rev. Microbiol. 2008. V. 62. № 1. P. 193–210.

68. *Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S.* // Science. 2004. V. 305. № 5690. P. 1622–1625.
69. *Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S.* // Science. 2002. V. 297. № 5584. P. 1183–1186.
70. *Eldar A., Elowitz M.B.* // Nature. 2010. V. 467. № 7312. P. 167–173.
71. *Rotem E., Loinger A., Ronin I., Levin-Reisman I., Gabay C., Shoresh N., Biham O., Balaban N.Q.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 28. P. 12541–12546.
72. *Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K.* // Cell. 2013. V. 154. № 5. P. 1140–1150.
73. *Hansen S., Vulic M., Min J., Yen T.J., Schumacher M.A., Brennan R.G., Lewis K.* // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 9. P. e39185. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039185
74. *Shyp V., Tankov S., Ermakov A., Kudrin P., English B.P., Ehrenberg M., Tenson T., Elf J., Hauryliuk V.* // EMBO Rep. 2012. V. 13. № 9. P. 835–839.
75. *Falla T.J., Chopra I.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1998. V. 42. № 12. P. 3282–3284.
76. *Hansen S., Lewis K., Vulic M.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. № 8. P. 2718–2726.
77. *Korch S.B., Hill T.M.* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 11. P. 3826–3836.
78. *Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K.* // Cell. 2018. V. 172. № 5. P. 1135–1135.
79. *Maisonneuve E., Shakespeare L.J., Jørgensen M.G., Gerdes K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 12. P. E2901. https://doi.org/10.1073/pnas.1803278115
80. *Goormaghtigh F., Fraikin N., Putrins M., Hallaert T., Hauryliuk V., Garcia-Pino A.* // MBio. 2018. V. 9. № 3. P. e00640-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18
81. *Tripathi A., Dewan P.C., Siddique S.A., Varadarajan R.* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 7. P. 4191–4205.
82. *Goormaghtigh F., Fraikin N., Putrinš M.* // MBio. 2018. V. 9. № 5. P. e01838-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01838-18
83. *Amato S.M., Orman M.A., Brynildsen M.P.* // Mol. Cell. 2013. V. 50. № 4. P. 475–487.
84. *Bernier S.P., Lebeaux D., DeFrancesco A.S., Valomon A., Soubigou G., Coppee J.Y., Ghigo J.M., Beloin C.* // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 1. P. e1003144. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144
85. *Fung D.K., Chan E.W., Chin M.L., Chan R.C.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. № 3. P. 1082–1093.
86. *Leung V., Lévesque C.M.* //J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 9. P. 2265–2274.
87. *Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y.* // Science. 2011. V. 334. № 6058. P. 982–986.
88. *Möker N., Dean C.R., Tao J.* // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 7. P. 946–1955.
89. *Vega N.M., Allison K.R., Khalil A.S., Collins J.J.* //Nat. Chem. Biol. 2012. V. 8. № 5. P. 431–433.
90. *Wu Y., Vulic M., Keren I., Lewis K.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. № 9. P. 4922–4926.
91. *Durfee T., Hansen A.M., Zhi H., Blattner F.R., Jin D.J.* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 3. P. 1084–1096.
92. *Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H.T., Zacharia V.M., Hightower G.A., Smith J.T., Conway T.* // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. № 5. P. 1128–1148.
93. *Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. № 2. P. 171–199.
94. *Gaca A.O., Kajfasz J.K., Miller J.H., Liu K., Wang J.D., Abranches J., Lemos J.A.* // mBio. 2013. V. 4. № 5. P. e00646–00613. https://doi.org/10.1128/mBio.00646-13
95. *Geiger T., Kästle B., Gratani F.L., Goerke C., Wolz C.* // J. Bacteriol. 2014. V. 196. № 4. P. 894–902.
96. *Dörr T., Lewis K., Vulic M.* //PLoS Genet. 2009. V. 5. № 12. P. e1000760. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760
97. *Unoson C., Wagner E.G.* // Mol. Microbiol. 2008. V. 70. № 1. P. 258–270.
98. *Bassler B.L., Losick R.* // Cell. 2006. V. 125. № 2. P. 237–246.
99. *Hu Y., Kwan B.W., Osbourne D.O., Benedik M.J., Wood T.K.* // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. № 4. P. 1275–1285
100. *Kwan B.W., Osbourne D.O., Hu Y., Benedik M.J., Wood T.K.* // Biotechnol. Bioeng. 2015. V. 112. № 3. P. 588–600
101. *Vega N.M., Allison K.R., Samuels A.N., Klempner M.S., Collins J.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 35. P. 14420–14425.
102. *Helaine S., Thompson J.A., Watson K.G., Liu M., Boyle C., Holden D.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 8. P. 3746–3751.
103. *Helaine S., Cheverton A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W.* // Science. 2014. V. 343. № 6167. P. 204–208.
104. *Dandekar T., Astrid F., Jasmin P., Hensel M.* // Front. Microbiol. 2012. V. 3. № 1. P. E164. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00164
105. *Wood T.K., Song S., Yamasaki R.* // J. Microbiol. 2019. V. 57. № 3. P. 213–219.
106. *Cataudella I., Trusina A., Sneppen K., Gerdes K., Mitarai N.* // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 14. P. 6424–6434.
107. *Cataudella I., Sneppen K., Gerdes K., Mitarai N.* // PLoS Comput. Biol. 2013. V. 9. № 8. P. e1003174. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003174
108. *Dhar N., McKinney J.D.* // Curr. Opin. Microbiol. 2007. V. 10. № 1. P. 30–38.
109. *Levin B.R., Rozen D.E.* // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 7. P. 556–562.
110. *Lafleur M.D., Qi Q., Lewis K.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. № 1. P. 39–44.
111. *Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K.* // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 23. P. 6191–6199.
112. *Al Mamun A.A., Lombardo M.J., Shee C., Lisewski A.M., Gonzalez C., Lin D., Nehring R.B., Saint-Ruf C., Gibson J.L., Frisch R.L.* // Science 2012. V. 338. № 6112. P. 1344–1348.
113. *Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K.* // Nature. 2004. V. 427. № 6969. P. 72–74.

114. *Trovatti E., Cotrim C.A., Garrido S.S., Barros R.S., Marchetto R.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008. V. 18. № 23. P. 6161–6164.

115. *Mutschler H., Gebhardt M., Shoeman R.L., Meinhart A.* // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 3. P. e1001033. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001033

116. *Tkachenko A.G.* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. V. 54. № 2. P. 108–127.

117. *Wexselblatt E., Oppenheimer-Shaanan Y., Kaspy I., London N., SchuelerFurman O., Yavin E., Glaser G., Katzhendler J., Ben-Yehuda S.* // PLoS Pathog. 2012. V. 8. № 9. P. e1002925. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925

118. *Brotz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H.P., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K.* // Nat. Med. 2005. V. 11. № 12. P. 1082–1087.

119. *Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Isabella V.M., Coleman K., Leonard S.N., Smith R.D., Adkins J.N., Lewis K.* // Nature. 2013. V. 503. № 7476. P. 365–370.

120. *Harrison J.J., Ceri H., Roper N.J., Badry E.A., Sproule K.M., Turner R.J.* // Microbiology. 2005. V. 151. № 10. P. 3181–3195.

121. *Sharma S.V., Lee D.Y., Li B., Quinlan M.P., Takahashi F., Maheswaran S., McDermott U., Azizian N., Zou L., Fischbach M.A.* // Cell. 2010. V. 141. № 1. P. 69–80.

Toxin-Antitoxin Loci and Bacterial Persistence (Review)

M. V. Zamakhaev[a], A. V. Goncharenko[a], and M. S. Shumkov[a, *]

[a] *Bach Institute of biochemistry, Federal State Institution "Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences", Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: shumkovm@gmail.com*

Received Desember 24, 2018; revised March 18, 2019; accepted June 20, 2019

Persistence is a phenomenon in which bacteria avoid the lethal effects of antibiotics due to the transition to a physiological state, which determines tolerance to antibacterial drugs. Among the factors that contribute into persistence, a special role is assigned to toxin-antitoxin (TA) systems, which are involved in the regulation of a wide range of physiological processes and make a significant impact on the outcome of antibiotic therapy. This review examines the mechanisms of participation of TA systems in the formation of persistent bacteria, discusses the clinical significance of the phenomenon of persistence and ways to fight phenotypically tolerant cells from the point of regulating the level of TA systems activity.

Keywords: toxin-antitoxin loci, persistence, antimicrobials, resistance