

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Григоров Артем Сергеевич

**Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к
стрессам**

Специальность – 1.5.3 – Молекулярная биология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ажикина Татьяна Леодоровна

Москва, 2023 г.

Оглавление

Список сокращений и условных обозначений.....	6
Введение.....	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы исследования	8
Цели и задачи.....	9
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования	11
Положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности результатов	12
Апробация результатов исследования	12
Структура и объем диссертации	12
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1 Введение.....	13
1.2 Подходы, используемые для поиска и характеристики бактериальных нкРНК.....	13
1.3 Механизмы действия бактериальных нкРНК	17
1.3.1 Механизмы действия бактериальных транс-кодируемых нкРНК.....	18
1.3.2 Участие шаперонных белков в механизмах действия бактериальных нкРНК	30
1.4 Ландшафт малых некодирующих РНК микобактерий	32
1.4.1 Хронология аннотации некодирующего транскрипта микобактерий.....	32
1.4.2 Примеры микобактериальных малых РНК.....	37
1.5 Заключение.....	41
Глава 2. Материалы и методы.....	42
2.1 Используемые бактериальные штаммы, культивирование и условия роста	42
2.2 Оценка оптической плотности бактериальной культуры	43
2.3 Выделение нуклеиновых кислот	43
2.4 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в геле.....	45
2.5 Рестрикция и модификация нуклеиновых кислот	45
2.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	46
2.7 Синтез кДНК и ОТ-ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР).....	47
2.8 Получение компетентных клеток и трансформация.....	47
2.9 Создание штамма <i>M. smegmatis</i> с делецией гена нкРНК F6 ($\Delta F6$)	48
2.10 Создание комплементированного ($\Delta F6::F6$) и контрольного ($\Delta F6::pMV306$) штаммов <i>M. smegmatis</i> с делецией гена нкРНК F6.....	49
2.11 Создание штаммов <i>M. smegmatis</i> для проверки взаимодействия нкРНК F6 и 5'-НТО мРНК MSMEG_4640	50

2.12 Создание гиперэкспрессирующих нкРНК MTS1338 и контрольных штаммов <i>M. smegmatis</i> (msm_pMV261_1338, msm_pMV261_E) и <i>M. tuberculosis</i> (mtb_pMV261_1338, mtb_pMV261_E).....	51
2.13 Создание транскрибирующего нкРНК MTS1338 и контрольного штаммов <i>M. smegmatis</i> , экспрессирующих GFP (msm_GFP_pMV261_1338, msm_GFP_pMV261_E).....	52
2.14 Стрессовые воздействия <i>in vitro</i>	52
2.15 Получение некультивируемых форм микобактерий.....	53
2.16 Реактивация некультивируемых форм микобактерий.....	54
2.17 Инфекция.....	54
2.18 Оценка выживаемости микобактерий.....	56
2.19 Измерение уровня включения радиоактивно меченного урацила.....	56
2.20 Нозерн-блоттинг.....	57
2.21 Вестерн-блоттинг.....	57
2.22 Конфокальная микроскопия.....	58
2.23 Количественная оценка флуоресценции GFP.....	59
2.24 Измерение концентрации белков по методу Бредфорда.....	59
2.25 Определение уровня цитокинов.....	60
2.26 Пробоподготовка библиотек для массового параллельного секвенирования и секвенирование.....	60
2.27 Анализ данных массового параллельного секвенирования.....	61
2.28 Депонирование данных массового параллельного секвенирования.....	62
2.29 Аннотация некодирующих РНК <i>M. smegmatis</i>	62
2.30 Пробоподготовка и исследование протеома.....	62
2.31 Предсказание мишеней бактериальных нкРНК.....	63
2.32 Статистический анализ.....	64
2.33 Визуализация.....	64
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	65
3.1 Полнотранскриптомное исследование <i>M. smegmatis</i> в условиях холодового стресса.....	65
3.1.1 Акклимационная фаза <i>M. smegmatis</i> длится до 24 часов.....	65
3.1.2 Транскриптомная адаптация <i>M. smegmatis</i> к условиям низких температур протекает в две стадии.....	66
3.1.3 Адаптация <i>M. smegmatis</i> к низким температурам приводит к глобальным транскриптомным изменениям.....	70
3.1.4. Аннотация некодирующего транскриптома <i>M. smegmatis</i>	72
3.1.5 Цис-кодируемые нкРНК.....	72
3.1.6 Транс-кодируемые нкРНК.....	75
3.2 Роль малой РНК F6 в переходе <i>M. smegmatis</i> в состояние покоя.....	79
3.2.1 Влияние гена нкРНК <i>M. smegmatis</i> F6 на фенотип бактерии в нормальных условиях.....	79
3.2.2 Делеция F6 вызывает изменения в экспрессии ряда генов <i>M. smegmatis</i>	83

3.2.3 мРНК <i>MSMEG_4640</i> является прямой молекулярной мишенью малой РНК F6.....	85
3.2.4 Делеция гена нкРНК F6 ингибирует переход <i>M. smegmatis</i> в состояние покоя	89
3.3 Роль малой РНК MTS1338 в адаптации <i>M. tuberculosis</i> к персистированию внутри макрофагов	95
3.3.1 MTS1338 накапливается в покоящихся бактериях, но не участвует в процессе реактивации	95
3.3.2 Пик транскрипции нкРНК MTS1338 в мышинной модели инфекции наблюдается после 10-й недели	96
3.3.3 Главным индуктором транскрипции MTS1338 <i>ex vivo</i> является NO	97
3.3.4 Гиперэкспрессия малой РНК MTS1338 способствует выживанию <i>M. tuberculosis</i> при действии стрессоров <i>in vitro</i>	100
3.3.5 Гиперэкспрессия MTS1338 в <i>M. tuberculosis</i> модулирует экспрессию стресс-специфических генов	102
3.3.6 Гетерологичная транскрипция малой РНК <i>M. tuberculosis</i> MTS1338 в <i>M. smegmatis</i> приводит к ингибированию роста.....	105
3.3.7 Гетерологичная транскрипция малой РНК <i>M. tuberculosis</i> MTS1338 стимулирует выживание <i>M. smegmatis</i> при заражении <i>ex vivo</i>	106
3.3.8 Гетерологичная транскрипция MTS1338 в <i>M. smegmatis</i> ингибирует нормальное созревание фаголизосом.....	107
3.3.9 Малая РНК MTS1338 модулирует экспрессию цитокинов в инфицированных макрофагах.....	109
3.3.10 MTS1338 влияет на экспрессию транскрипционных факторов <i>M. smegmatis</i> и белков, вовлеченных в ремоделинг клеточной стенки.....	111
3.3.11 MTS1338 стимулирует секрецию белков, вовлеченных в механизмы вирулентности и клеточной проницаемости	111
Заключение	114
Выводы	116
Список литературы	117
Приложения.....	131
Приложение А.....	131
Список использованных в исследовании олигонуклеотидов	131
Приложение Б	133
Схема создания конструкции для делеции гена нкРНК F6 <i>M. smegmatis</i>	133
Приложение В.....	134
Схема создания конструкции для комплементации штамма Δ F6 <i>M. smegmatis</i>	134
Приложение Г	135
Схема создания репортерной системы для проверки взаимодействия нкРНК F6 и 5'-НТО мРНК <i>MSMEG_4640</i>	135
Приложение Д.....	136
Схема создания конструкции для транскрипции MTS1338.....	136
Приложение Е	137

Схема создания конструкции для одновременной транскрипции MTS1338 и экспрессии GFP	137
Приложение Ж.....	138
Подтверждение выявленных дифференциально экспрессированных генов <i>M. smegmatis</i> в условиях холодового стресса	138
Приложение И.....	139
Список идентифицированных некодирующих РНК <i>M. smegmatis</i>	139
Приложение К.....	141
Вторичные структуры выявленных транс-кодируемых нкРНК.....	141
Приложение Л.....	143
Предсказанные мРНК мишени выявленных транс-кодируемых нкРНК.....	143
Приложение М.....	146
Список генов, дифференциально экспрессированных в штамме <i>M. smegmatis</i> Δ F6	146
Приложение Н.....	147
Оценка транскрипции F6 в мутантном (Δ F6) и комплементированном (Δ F6:F6) штаммах <i>M. smegmatis</i>	147
Приложение П.....	148
Список предсказанных мРНК мишеней для малой РНК F6 <i>M. smegmatis</i>	148
Приложение Р	149
Транскрипция гена <i>MSMEG_4640</i> в модели покоя <i>M. smegmatis</i>	149
Приложение С.....	150
Дифференциально экспрессированные гены в <i>M. tuberculosis</i> при гиперэкспрессии MTS1338	150
Приложение Т.....	155
Подтверждение транскрипции MTS1338 в <i>M. smegmatis</i>	155
Приложение У.....	156
Различия в протеомах штамма <i>M. smegmatis</i> с гетерологичной транскрипцией MTS1338 и штамма с контрольным вектором	156
Приложение Ф	160
Различия в секретомах штамма <i>M. smegmatis</i> с гетерологичной транскрипцией MTS1338 и штамма с контрольным вектором	160
Приложение Х.....	162
Подтверждение результатов протеомного профилирования <i>M. smegmatis</i> на транскриптомном уровне	162

Список сокращений и условных обозначений

- 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область
- кДНК - комплементарная ДНК
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- МИ – множественность инфекции
- НВЧ – наиболее вероятное число
- ОП₆₀₀ – оптическая плотность культуры при длине световой волны 600 нм
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- п.н. – пар нуклеотидов
- FDR – ожидаемая доля ложных отклонений (False discovery rate)
- IFN- γ – интерферон гамма (Interferon gamma)
- IL – интерлейкин (Interleukin)
- L-NIL – N ϵ -(1-иминоэтил)-L-лизина гидрохлорид
- Log₂FC – логарифм отношения с основанием 2, или Log₂ Fold Change; мера, которая используется для определения степени изменения экспрессии гена между двумя условиями
- МТВ – *Mycobacterium tuberculosis*
- Мф – макрофаги
- RNA-seq – РНК-секвенирование (RNA sequencing)
- P_{adj} – скорректированное р-значение (p adjusted)
- RPKM – нормализованные значения прочтений на 1 миллион прочтений (Read Per Kilobase per Million mapped reads)
- TPM – нормализованные значения транскриптов на 1 миллион прочтений (Transcripts per million)
- WT – дикий тип (Wild type)

Введение

Актуальность темы исследования

Микобактерии — это разнообразный род бактерий, разделяемый на свободноживущие (непатогенные) и патогенные виды; каждая из групп имеет свои экологические ниши и испытывает свое эволюционное давление. Свободноживущие виды микобактерий, которые часто могут быть найдены в почве и воде, играют жизненно важную роль в экосистемах, участвуя в круговороте питательных веществ и взаимодействуя с другими микробными сообществами. Они также представляют биотехнологический интерес из-за их потенциала в области биоремедиации и производства биологически активных соединений. Патогенные микобактерии, наиболее известный представитель которых, *Mycobacterium tuberculosis*, является возбудителем туберкулеза, развили сложные механизмы заражения и персистенции в организмах-хозяевах. Способность уклоняться от иммунного ответа хозяина в сочетании с уникальной клеточной стенкой делает их опасными микроорганизмами, а микобактериальные инфекции - сложными для лечения заболеваниями.

И патогенные, и непатогенные виды бактерий встречаются в своих жизненных циклах большое число биотических и абиотических стресс-факторов, которые играют ключевую роль в выживании, распространении и формировании эволюционных траекторий микроорганизмов. Биотические стрессы представляют собой факторы, связанные с живыми компонентами окружающей среды; среди них можно отметить иммунные реакции организма-хозяина в контексте патогенеза, бактериофаги или любые другие организмы, которые способны оказывать давление на бактериальные популяции или конкурировать с ними. Абиотические стрессы включают такие факторы неживой природы как колебания температуры, изменение кислотности и градиента солености, радиация и нехватка питательных веществ.

Оба набора стрессов требуют от микроорганизмов определенных адаптивных реакций, зависящих от контекста. В процессе эволюции бактерии выработали широкий набор адаптивных механизмов, позволяющий им выживать в неблагоприятных условиях, одним из которых является регуляция транскриптома при помощи некодирующих малых РНК¹.

¹ Далее в тексте будет использовано одно из определений: нкРНК, малые некодирующие РНК, регуляторные РНК или малые РНК; в данной работе эти определения будут считаться синонимами

Традиционно внимание исследователей сосредоточено на изучении некодирующего транскриптома патогенных микобактерий, в частности, *M. tuberculosis*. Однако нельзя недооценивать значения изучения некодирующих РНК непатогенных видов микобактерий (или микобактерий окружающей среды). Данные исследования обеспечивают понимание эволюционных траекторий видов всего рода и путей адаптации, которые могли привести к появлению патогенных штаммов. Изучение регуляторных РНК свободноживущих микобактерий также важно для определения их экологической роли и понимания механизмов взаимодействия с другими микроорганизмами. Таким образом, расширение сферы исследований транскриптомов за пределы патогенных штаммов обеспечивает более целостный взгляд на микобактериальную биологию и эволюцию, что влияет и на поиск более оптимальных терапевтических стратегий.

Степень разработанности темы исследования

Исследование роли малых регуляторных РНК в адаптации микобактерий к стрессовым условиям представляет собой актуальное и многогранное направление в молекулярной биологии и микробиологии. Несмотря на то, что многие аспекты механизмов, связанных с нкРНК микобактерий известны для наиболее распространенного патогена *M. tuberculosis* и главной модельной микобактерии *Mycobacterium smegmatis* гораздо детальнее, чем для многих других бактерий, аннотация некодирующего транскриптома этих видов менее развита по сравнению с другими модельными видами бактерий (*E. coli*, *B. subtilis*) и ограничена лишь небольшим числом систематических исследований [1–4]. Известны лишь несколько микобактериальных нкРНК, для которых была выявлена функциональная значимость и доказана их молекулярная мишень [5; 6].

Следует отметить, что на сегодняшний день известно множество механизмов адаптации бактерий к стрессовым условиям, однако участие малых РНК в этих процессах остается все еще малоизученным аспектом. Накопление новых данных позволит расширить наше понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе адаптации микобактерий к стрессам, и в долгосрочной перспективе может иметь практическое значение для разработки новых подходов в диагностике и терапии инфекционных болезней, вызываемых микобактериями.

Цели и задачи

Цель: изучение роли малых некодирующих РНК микобактерий в ответе на различные стрессы на примерах *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Характеризация транскриптомного ответа *M. smegmatis* в условиях холодного стресса и выявление некодирующих РНК, которые могут участвовать в адаптации к низким температурам.
2. Создание штамма *M. smegmatis* с делецией гена малой некодирующей РНК F6.
3. Описание штамма *M. smegmatis* с делецией гена малой некодирующей РНК с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК и *in vitro* экспериментов.
4. Создание штамма *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующий малую некодирующую РНК MTS1338.
5. Характеризация штамма *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией гена малой некодирующей РНК MTS1338 с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК, *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* экспериментов.
6. Создание штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией гена малой некодирующей РНК *M. tuberculosis* MTS1338.
7. Описание штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией малой некодирующей РНК *M. tuberculosis* MTS1338 с помощью протеомного профилирования, *in vitro* и *ex vivo* экспериментов.

Научная новизна

- Впервые подробно проанализированы изменения транскриптома *M. smegmatis* при холодном стрессе; выявлены группы генов, определяющих успешную адаптацию *M. smegmatis* к низким температурам; значительно расширена существующая аннотация регуляторных РНК *M. smegmatis*.
- Впервые охарактеризован фенотип и транскриптом штамма *M. smegmatis* с делецией гена малой РНК F6. Выявлено, что F6 принимает участие в регуляции ответа микобактерии на окислительный стресс и контролирует переход *M. smegmatis* в

состояние покоя; установлено, что молекулярной мишенью F6 является мРНК гена *MSMEG_4640*, который кодирует фактор ресусцитации RpfE2.

- Выявлена последовательность молекулярных событий, приводящих к транскрипции регуляторной РНК *M. tuberculosis* MTS1338 в условиях заражения *ex vivo*; установлено, что главным индуктором транскрипции MTS1338 является монооксид азота (NO), генерируемый индуцибельной NO-синтазой (iNOS).
- Впервые показано, что гиперэкспрессия MTS1338 в *M. tuberculosis* активирует транскрипцию ряда генов, способствующих выживанию бактерии *in vitro* в условиях, имитирующих макрофагальные стрессы.
- Впервые продемонстрировано, что гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* приводит к появлению у штамма ряда патогенных свойств, а именно повышает выживаемость бактерии в условиях инфекции *ex vivo* путем замедления созревания фаголизосом, модуляции транскрипции ряда цитокинов в инфицированных макрофагах и секреции бактерией потенциальных факторов вирулентности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования результаты важны как для развития фундаментальной науки, так и для прикладного научно-медицинского использования. Определена роль малых некодирующих РНК в регуляции генной экспрессии и адаптации микобактерий к стрессовым условиям, а также их влияние на патогенные свойства микобактерий. Эти результаты способствуют глубокому пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе жизненных процессов бактерий.

На практике, работа открывает перспективы для дальнейшего изучения некодирующих РНК *M. tuberculosis* в области диагностики и терапии туберкулеза. Было продемонстрировано, что некодирующая РНК MTS1338 играет важную роль в патогенезе, что делает её перспективной кандидатной терапевтической мишенью, представляющей альтернативу существующим подходам. Возможность использования некодирующих РНК в качестве потенциальных биомаркеров и терапевтических мишеней требует дополнительных исследований и клинических испытаний для подтверждения их эффективности и безопасности.

Методология и методы исследования

В работе были использованы молекулярно-биологические, биохимические подходы, а также передовые методы транскриптомики и биоинформатического анализа. Для более глубокого понимания молекулярных механизмов действия некодирующих РНК были использованы методы высокопроизводительного РНК-секвенирования и масс-спектрометрического анализа протеома.

В работе также проводились микробиологические и цитологические исследования с использованием патогенных бактериальных культур и эукариотических клеток, что позволило более полно охарактеризовать взаимодействие некодирующих РНК в различных системах. Эксперименты с использованием животных проводились в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза в строгом соответствии с этическими нормами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей под гарантией № А5502-11 Управления защиты лабораторных животных Национального института здравоохранения (НИИ). Все этапы исследования *M. tuberculosis* выполнялись в лабораторных условиях Института биохимии им. Баха РАН, с соблюдением всех необходимых стандартов и рекомендаций, утвержденных Министерством здравоохранения Российской Федерации.

Положения, выносимые на защиту

1. Существует 56 некодирующих РНК *M. smegmatis*, которые изменяют свою экспрессию в условиях холодового стресса.
2. Малая некодирующая РНК *M. smegmatis* F6 регулирует переход бактерии в некультивируемое состояние путем прямого контроля экспрессии фактора ресусцитации MSMEG_4640 и вовлечена в ответ на окислительный стресс.
3. Основным триггером транскрипции малой некодирующей РНК *M. tuberculosis* MTS1338 в условиях заражения *ex vivo* является NO, продуцируемый синтазой оксида азота iNOS.
4. Гиперэкспрессия MTS1338 повышает выживание *M. tuberculosis* в условиях разных стрессов и приводит к экспрессии ряда генов, связанных с адаптацией к неблагоприятным условиям.

5. Гетерологичная транскрипция MTS1338 в непатогенной бактерии *M. smegmatis* повышает выживание штамма при заражении макрофагов *ex vivo*, замедляет созревание фаголизосом и приводит к модуляции экспрессии ряда цитокинов.

6. Гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* меняет протеом и секретом бактерии, приводя к экспрессии потенциальных факторов вирулентности.

Степень достоверности результатов

Данные, полученные в работе, характеризуются надежностью и воспроизводимостью. Примененные подходы являются признанными стандартами в данной научной области; выявленные зависимости обоснованы с помощью статистических методов. Экспериментальные результаты непосредственно подтверждают выводы, изложенные в данной диссертации.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных школах и конференциях: VIII Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы живых систем», Звенигород, 19–23 ноября, 2018; 44th FEBS Congress 2019, Krakow, Poland, 6–11 июля, 2019; EMBO | EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology, Heidelberg, Germany, 10–13 июля, 2019; VI Съезд биохимиков России, Дагомыс, 1–6 октября, 2019; EMBO | EMBL Symposium: The Non-Coding Genome, Heidelberg, Germany, 16–19 Октября, 2019; EMBO Workshop on Tuberculosis, Paris, France, 12–16 сентября, 2022; VII Съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России, Дагомыс, 3–7 октября 2022.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа представлена на 162 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу, 51 рисунок и 19 приложений. Библиографический указатель включает 189 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Введение

Mycobacterium tuberculosis, инфекционный агент туберкулеза, это бактериальный патоген, который чаще всего поражает легкие, но способен колонизировать и другие органы организма. Туберкулез остаётся одной из ключевых проблем здравоохранения на глобальном уровне и продолжает быть одной из основных причин смертей в странах с низким уровнем доходов [7].

M. tuberculosis характеризуется широким набором уникальных особенностей и способен адаптироваться к разнообразным стрессам, таким как голодание, гипоксия, окислительный, кислотный и нитрозативный стрессы; а также обладает сложными механизмами управления иммунными реакциями хозяина для установления персистирующей инфекции [8]. Понимание основ этого взаимодействия между *M. tuberculosis* и клетками иммунной системы хозяина, а также того, как именно патоген адаптируется к стрессам, имеет решающее значение для создания методов лечения нового поколения.

В этом контексте малые некодирующие РНК (нкРНК) *M. tuberculosis* являются интригующим и перспективным направлением исследований. Эти молекулы представляют собой ключевые регуляторы экспрессии генов у широкого набора организмов и играют особенно важную роль в механизмах вирулентности, адаптации к стрессу и резистентности к антибиотикам [9–11]. Таким образом, исследование микобактериальных нкРНК может привести к открытию новых направлений в диагностике, лечении и профилактике туберкулеза.

В данном обзоре основное внимание будет уделено различным методикам и подходам, используемым для исследования нкРНК в бактериях, основным механизмам их действия, истории изучения и современного состояния проблемы некодирующего транскриптома в микобактериях.

1.2 Подходы, использующиеся для поиска и характеристики бактериальных нкРНК

Транскриптомные подходы. Эта группа методов основана на секвенировании и анализе всей совокупности РНК транскриптов бактериальной клетки. Наиболее используемые на данный момент варианты этого подхода включают РНК-секвенирование и технологию ДНК-микрочипов

[12; 13]. С их помощью можно не только получить информацию, которая позволяет предположить местоположение генов нкРНК в геноме, но и охарактеризовать паттерн транскрипции каждого конкретного гена. К плюсам данного типа подходов можно отнести то, что он позволяет провести комплексный анализ, описывающий весь транскриптом организма. Полученные данные представляют собой количественные измерения, что делает возможным сравнение результатов экспрессии генов как между собой, так и в различных условиях. Также стоит отметить большое количество стандартизированных методик и вариантов анализа данных [14].

Тем не менее, существует ряд ограничений при использовании транскриптомных подходов. Прежде всего они касаются пределов чувствительности и ограниченного динамического диапазона (особенно в случае использования ДНК-микрочипов). Оценка транскрипции слабо транскрибируемых нкРНК может быть сильно занижена при анализе, или транскрипты остаются невыявленными из-за того, что активно транскрибирующиеся РНК насыщают систему детекции. При этом, любые данные, полученные с помощью транскриптомных подходов, необходимо валидировать с помощью ряда других экспериментальных методов.

Вычислительные предсказания. Важная, активно развивающаяся в настоящий момент, группа методов, которая использует *in silico* подходы для предсказания генов нкРНК и их потенциальных функций. Биоинформатический анализ данных включает в себя обработку геномных последовательностей и вторичных структур при помощи алгоритмов и программ с целью поиска характерных мотивов и элементов, свойственных нкРНК [15]. Также в анализе используются данные сравнительной геномики, позволяющие идентифицировать консервативные области геномов у разных видов, и информация об уже известных промоторах и других регуляторных элементах.

Несмотря на ограничения *in silico* методов, связанные с предвзятостью алгоритма в отношении уже известных РНК-структур [16], они эффективны, масштабируемы и позволяют детектировать нкРНК, которые были упущены при экспериментальных скринингах. Тем не менее, самой существенной проблемой биоинформатических предсказаний является большое количество ложноположительных результатов, поэтому любые полученные в ходе такого анализа данные нуждаются в тщательной экспериментальной проверке.

Отдельно стоит упомянуть, что вычислительные методы активно используются для поиска мишеней бактериальных нкРНК [17; 18]. Существующие алгоритмы позволяют быстро проверять вероятность образования РНК-РНК дуплекса между нкРНК и потенциальными мРНК-кандидатами, что позволяет существенно ускорить и удешевить последующие экспериментальные этапы.

Экспериментальная валидация. После предсказания генов потенциальных нкРНК, необходимым шагом для подтверждения их существования и описания функциональной роли, является экспериментальное подтверждение. Для этого могут быть использован широкий набор разработанных методов, наиболее частые из которых включают нозерн-блот, ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), удлинение праймера и быструю амплификацию концевых фрагментов РНК (RACE) [19]. Эти методы также могут использоваться для определения уровней транскрипции малых РНК и их взаимодействия с другими молекулами.

Функциональные подходы. Большая группа экспериментальных методов, которая является неотъемлемой составляющей изучения бактериальных нкРНК, т.к. предоставляет прямые доказательства их биологической активности и регуляторных функций. В широком смысле, эти подходы включают в себя экспериментальные методы, направленные на изучение влияния нкРНК на экспрессию генов, клеточные процессы и фенотип микроорганизма.

Функциональные подходы часто опираются на манипуляцию уровнем и активностью нкРНК с последующей оценкой биохимических, транскриптомных, протеомных и фенотипических изменений, что позволяет получить представление о функциональной значимости нкРНК в бактериальной системе. Наиболее распространенными вариантами подобных манипуляций является создание мутантных штаммов бактерий, в которых транскрипция гена изучаемой нкРНК усилена (гиперэкспрессия) или полностью подавлена (делеция гена нкРНК) [19]. Реже используются системы, в которых количество нкРНК модулируется с помощью интерферирующего транскрипта, например CRISPRi технология [20]. Существуют также подходы, основанные на мутировании предположительно функционально значимых элементов нкРНК [19].

Полученный штамм может быть охарактеризован с помощью широкого профиля экспериментальных методов, включающих изучение любых фенотипических, биохимических и молекулярно-генетических свойств. При любом экспериментальном описании используется специальная система контролей: комплементарный мутантный штамм в случае нокаут метода и контрольные генетические конструкции в случае штамма с гиперэкспрессией.

Важной группой методов, используемых для описания нкРНК, являются репортерные подходы. Основной идеей репортерного подхода является проверка влияния нкРНК на экспрессию конкретного гена-мишени с помощью детектируемого сигнала, который продуцирует репортерный ген при экспрессии [21]. Распространенными вариантами репортерных генов являются ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp* и ген β -галактозидазы *lacZ*. Ключевым этапом любого репортерного метода является внесение в регуляторную последовательность репортерного гена предполагаемого сайта связывания с изучаемой нкРНК. Возможность детекции сигнала позволяет оценить эффективность экспрессии полученной репортерной

конструкции в присутствии и отсутствии изучаемой нкРНК в условиях *in vivo*, что чаще всего позволяет напрямую подтвердить или опровергнуть гипотезу о её регуляторной активности в отношении данной мишени.

Еще одним мощным инструментом для изучения функций нкРНК являются методы с использованием транспозонов. При использовании транспозонного секвенирования, такого как Tn-seq, можно проанализировать влияние транспозонной вставки в разные места последовательности генома на фенотип бактерии [22]. Это метод обеспечивает глубокий анализ и позволяет идентифицировать как «эссенциальные» (незаменимые) гены нкРНК, так и отдельные фрагменты генов, кодирующие функционально значимые участки и регионы, включая области нкРНК.

Биохимические подходы. Биохимические подходы включают в себя различные методы, которые позволяют изучить свойства нкРНК и их взаимодействия с другими молекулами на молекулярном уровне. Они включают в себя различные типы хроматографии, спектроскопию, масс-спектрометрию, рентгеновскую кристаллографию и другие методики.

Одним из классических примеров подобного подхода является метод RNA pull-down, который часто применяется для идентификации молекулярных партнеров нкРНК [23]. Основной принцип pull-down метода заключается в том, что одна из интересующих нас молекул (обычно известная как «bait» или «приманка») модифицируется таким образом, чтобы ее можно было легко и специфически выделить из смеси. Эта «приманка» затем смешивается с другими молекулами (обычно в солевом буфере или клеточном лизате), и любые молекулы, которые взаимодействуют с «приманкой», ко-иммуносорбируются при изоляции.

Вариации pull-down методов включают различные стратегии мечения «приманки» и различные методы для ее выделения. Например, РНК-«приманка» может быть мечена биотином, который затем взаимодействует со стрептавидином, присоединенным к твердой подложке, такой как магнитные бусины. Альтернативно, если «приманка» — это белок, он может быть модифицирован с помощью эпитопов, которые затем могут быть выделены с использованием специфических антител.

После выделения комплекса «приманки» с молекулами-мишенями, взаимодействующие молекулы можно идентифицировать и характеризовать с помощью различных методов, включая масс-спектрометрию белков [24] и секвенирование РНК [25; 26].

Приведенная классификация представляет собой упрощенную и условную систематизацию наиболее применяемых методов, используемых для идентификации и характеристики нкРНК в бактериях. Выбор конкретной методологии определяется целью исследования, доступными ресурсами и уникальными особенностями изучаемого

биологического объекта. Комплексное применение разнообразных методик позволяет провести более глубокий анализ функций и регуляторных механизмов нкРНК в бактериальных системах.

1.3 Механизмы действия бактериальных нкРНК

Малые некодирующие РНК (нкРНК) играют ключевую роль в сложных процессах регуляции экспрессии бактериальных генов. Они представляют собой РНК длиной от ~30 до ~500 нуклеотидов, обычно без открытых рамок считывания. Они выполняют регуляторные функции на РНК уровне, влияя на разнообразные клеточные процессы, включающие ответ на различные стрессы, метаболические процессы и патогенез. При этом, нкРНК характеризуются пластичной транскрипцией, что позволяет быстро настраивать транскриптом и менять метаболизм бактерии, обеспечивая реакцию на новые условия [27].

Механизм действия большинства нкРНК, предполагает спаривание оснований нкРНК с комплементарными им областями мРНК-мишеней, что может влиять на стабильность или трансляцию последних. Малые некодирующие РНК могут быть разделены на два крупных подкласса: цис-кодируемые нкРНК (также называемые антисмысловыми РНК) и транс-кодируемые нкРНК (или межгенные нкРНК) (Рисунок 1).

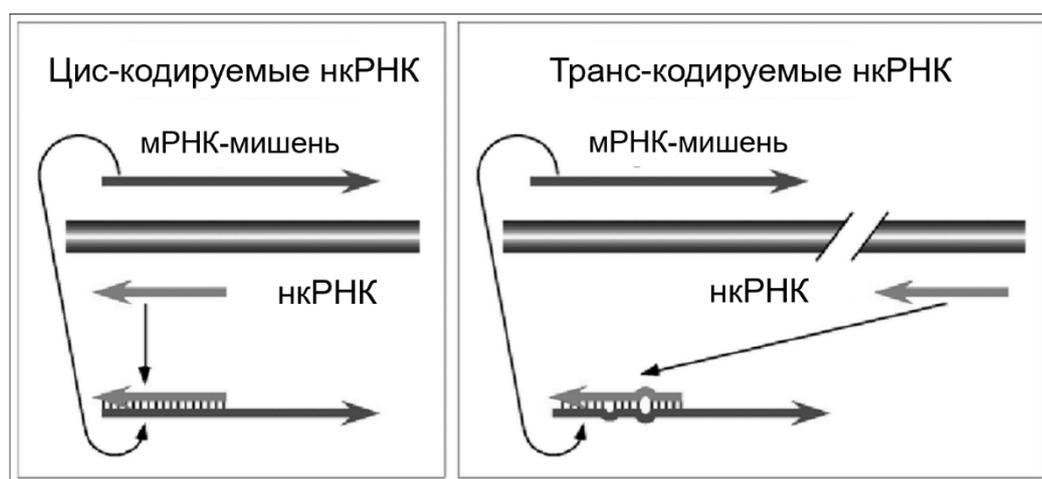


Рисунок 1 – Схематическое изображение механизмов действия цис-кодируемых и транс-кодируемых нкРНК; адаптировано из [28]

Цис-кодируемые нкРНК транскрибируются с цепи ДНК, противоположной той, с которой идет транскрипция гена, который они регулируют. Они, как правило, характеризуются полной

комплементарностью с их мРНК мишенью, что обеспечивает формирование протяженного РНК-РНК дуплекса [29].

Примером хорошо изученной цис-кодируемой нкРНК является малая РНК SymR *E. coli*. Это малая РНК представляет собой транскрипт длиной 77 нуклеотидов, который комплементарен 5'-области мРНК SOS-индуцируемого токсина с экзонуклеазной активностью SymE [30]. В данном контексте SymR функционирует как РНК-антитоксин, действуя в качестве репрессора. Эта нкРНК контролирует уровень транскрипции *symE*, стимулируя деградацию мРНК этого гена. SymR представляет яркий пример того, как цис-кодируемые нкРНК могут играть решающую роль в поддержании клеточного гомеостаза.

Транс-кодируемые РНК, напротив, транскрибируются в межгенных локусах и имеют лишь ограниченную область комплементарности с их мРНК-мишенью (обычно 6-12 нуклеотидов). Это позволяет им участвовать в регуляции сразу нескольких транскриптов. Классический механизм действия транс-кодируемых малых РНК предполагает взаимодействие нкРНК с мРНК в области, находящейся рядом с сайтом связывания рибосом (или перекрывающей его), что может вести к активации или, чаще, к ингибированию трансляции [31]. Однако существует достаточно большое количество вариантов альтернативных механизмов, более подробное рассмотрение которых представлено в следующей главе.

1.3.1 Механизмы действия бактериальных транс-кодируемых нкРНК

Позитивная регуляция. Механизм активации экспрессии с помощью транс-кодируемых РНК может быть реализован в виде двух основных вариантов. Первый называется «анти-антисенс» механизмом и подразумевает наличие в мРНК-мишени вторичной структуры в районе последовательности Шайна-Дальгарно, которая препятствует процессу трансляции. Малая некодирующая РНК, контролирующая экспрессию мРНК, способна взаимодействовать с ней, приводя к изменению вторичной структуры и высвобождению регуляторных последовательностей инициации трансляции.

Примером малой РНК, действующей согласно такому механизму, является нкРНК RNAIII патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* [32]. RNAIII связывается с мРНК *hla*, что приводит к дестабилизации вторичной структуры типа «шпилька», которая ингибирует трансляцию. Важно отметить, что это не единственная функция RNAIII. Эта нкРНК также несет в своей последовательности открытую рамку считывания, кодирующую δ -гемолизин [33] и напрямую ингибирует трансляцию ряда генов, участвующих в процессах вирулентности [34; 35].

Второй механизм активации называется трансляционно-независимым и предполагает связывание малой РНК с кодирующей последовательностью транскрипта мРНК, что приводит к стабилизации последнего. Примером нкРНК, работающей по этому механизму, является SgrS из *Salmonella typhimurium*. SgrS контролирует экспрессию гена фосфатазы *yigL*, который необходим для выживания в условиях фосфосахарного стресса - состояния которое возникает у бактерий при накоплении фосфорилированных форм сахаров в клетке [36]. SgrS стабилизирует интермедиат бицистронного транскрипта *pldB-yigL*, который в нормальных условиях гидролизуется РНКазой E (Рисунок 2). При этом, SgrS, подобно RNAIII, способна негативно регулировать экспрессию ряда генов (*ptsG*, *manX*, *sopD*) [37; 38] и содержит открытую рамку считывания короткого пептида SgrT [39].

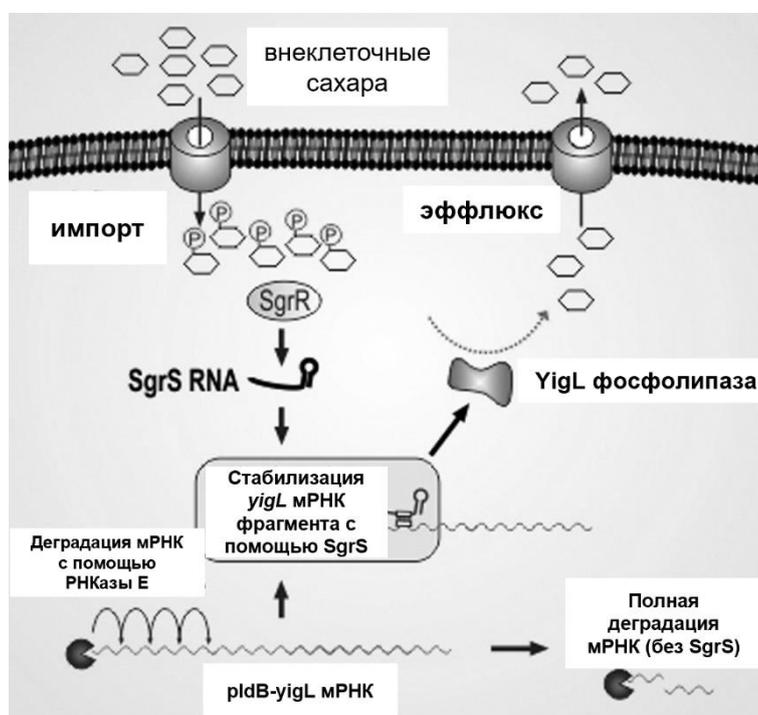


Рисунок 2 – Схема механизма действия малой нкРНК SgrS *S. typhimurium*; адаптировано из [36]

Негативная регуляция. Негативная регуляция экспрессии является более частым эффектом действия бактериальных нкРНК и может быть реализована через механизм преждевременной терминации транскрипции, репрессии трансляции и стимулирования деградации мРНК.

Преждевременная терминация транскрипции происходит в том случае, если после спаривания нкРНК с её мРНК мишенью образуется транскрипционный аттенюатор – вторичная

структура, стимулирующая остановку транскрипции. Транскрипционная антитерминация является одним из двух открытых механизмов, согласно которым действует малая РНК RnaG патогенной бактерии *Shigella flexneri* [40]. RnaG регулирует экспрессию гена *icsA*, который кодирует белок, играющий ключевую роль в процессе инвазии в эпителиальные клетки кишечника. Авторы работы показали, что RnaG подавляет экспрессию *icsA* двумя способами. Первый происходит за счет транскрипционной интерференции: транскрипция с сильного промотора *RnaG* подавляет транскрипцию со слабого промотора *icsA* из-за того, что оба промотора перекрываются. Второй механизм репрессии заключается в том, что RnaG способна связываться с последовательностью, находящейся в открытой рамке считывания *icsA*, стимулируя образование внутреннего терминатора и, как следствие, преждевременно останавливая транскрипцию этого гена.

Ингибирование трансляции является наиболее изученным способом посттранскрипционной регуляции экспрессии, осуществляемой с помощью бактериальных регуляторных РНК, а также является самым распространенным механизмом их действия. Реализация этого варианта чаще всего заключается в прямой конкуренции нкРНК за сайт связывания рибосом мРНК мишени. Регуляторная РНК связывается с областью мРНК, перекрывающейся с последовательностью Шайна-Дальгарно, или достаточно близко от неё. Образование РНК-РНК дуплекса предотвращает дальнейшую ассоциацию мРНК с 30S-субъединицей рибосомы, блокируя трансляцию.

Каноничным примером такого механизма является взаимодействие нкРНК MicA *E. coli* с её мРНК-мишенью [41]. MicA транскрибируется в поздней стационарной фазе роста и подавляет экспрессию порина внешней мембраны OmpA путем спаривания с 5'-нетранслируемой областью мРНК *ompA* в районе последовательности Шайна-Дальгарно. Избыток MicA в клетке приводит к ингибированию связывания рибосомы с сайтом старта трансляции *ompA*, что в дальнейшем стимулирует деградацию транскрипта с помощью РНКазы E.

При этом для ингибирования трансляции нкРНК могут связываться не только с самой областью Шайна-Дальгарно, но и с фланкирующими ее регионами, которые контактируют с 30S-субъединицей рибосомы. Это открывает потенциальные возможности для контроля экспрессии безлидерных мРНК с помощью нкРНК [42].

Схожий механизм ингибирования трансляции предполагает спаривание регуляторной РНК с определенными сайтами мРНК, которые располагаются в 5'-НТО, более чем за 100 нуклеотидов от сайта старта трансляции. Несмотря на удаленность от региона, контактирующего с 30S-субъединицей рибосомы, такое связывание также приводит к остановке инициации трансляции. Примером нкРНК, действующей согласно этому механизму, является малая РНК

GcvB *Salmonella enterica*, которая связывает некоторые свои мРНК-мишени в областях трансляционных энхансеров, удаленных от последовательности Шайна-Дальгарно [43].

Ещё один «ингибирующий» вариант действия нкРНК заключается в рекрутировании различных рибонуклеаз для регуляции деградации мРНК-мишени. Ингибирование трансляции, опосредованное малыми РНК, часто делает мРНК-мишень более доступной для различных рибонуклеаз, как, например, было описано для малой РНК *E. coli* MicA и регулируемого ей транскрипта *ompA* [41]. По всей видимости, это связано с тем, что рибосома больше не экранирует мРНК-мишень от действия рибонуклеаз. Однако деградация с помощью РНКаз может быть не только пассивным следствием ингибирования инициации трансляции, но и активным эффектом действия нкРНК. В этом случае, сайт образования дуплекса с нкРНК может располагаться практически в любом регионе мРНК. Примером нкРНК, действующей согласно такому механизму, является малая РНК MicC *S. typhimurium*, которая контролирует экспрессию порина OmpD. Регион, образующий РНК-РНК дуплекс с MicC находится в районе +67 – +78 относительно старт-кодона мРНК *ompD* [44]. Образование РНК-РНК дуплекса не оказывает прямого влияния на ингибирование инициации трансляции и не останавливает рибосому во время процесса элонгации. Малая РНК MicC направляет и активирует РНКазу E для расщепления мРНК в сайте узнавания [45]. Особую роль в этом механизме играет 5'-конец нкРНК, на котором должна быть представлена монофосфатная группа. Именно 5'-конец регуляторной РНК делает РНК-РНК дуплекс уязвимым для атаки РНКазой E, которая содержит специальный 5'-чувствительный «карман». Взаимодействие 5'-монофосфата MicC и этого «кармана» запускает конформационную перестройку фермента в состояние, наиболее оптимальное для расщепления одноцепочечного субстрата. Во время этого процесса в активном сайте фермента размещается именно мРНК-мишень.

Опосредованное влияние. В случае би- и полицистронных транскриптов, влияние нкРНК на трансляцию может быть опосредованным и модулировать экспрессию одной рамки считывания через изменение экспрессии другой. Впервые этот механизм был показан для малой некодирующей РНК *E. coli* RyhB, которая участвует в регуляции процессов метаболизма железа. Матричная РНК транскрипционного железозависимого репрессора Fur имеет дополнительную рамку считывания (*uof*), которая содержит 28 кодонов, находится перед кодирующей последовательностью *fur* и перекрывается с ней с 5'-конца (Рисунок 3) [46]. Трансляция *fur* зависит от трансляции проксимальной рамки считывания *uof*, что было показано как в *in vitro*, так и в *in vivo* экспериментах. Рамка считывания *uof*, в свою очередь, содержит регион, комплементарный нкРНК RyhB. Образование соответствующего РНК-РНК дуплекса ингибирует трансляцию как самой *uof*, так и нижерасположенной открытой рамки считывания *fur*. Таким образом, RyhB, блокируя трансляцию соседней рамки считывания, ингибирует и трансляцию

транскрипта мРНК в области, отдаленной от места взаимодействия более чем на 350 нуклеотидов [48]. На первом этапе происходит ингибирование инициации трансляции. После того, как «последняя» транслирующая рибосома проходит сайт эндонуклеазы, комплекс RyhB с шаперонным белком Hfq запускает опосредованное деградосомой расщепление транскрипта *sodB*. Предполагается, что многие другие нкРНК, участвующие в ингибировании трансляции, могут действовать согласно этому механизму. Тем не менее, на молекулярном уровне различить оба процесса достаточно сложно, что не позволяет сделать окончательного вывода о распространенности вышеописанного механизма.

Секвестрация белков. Существуют бактериальные нкРНК, механизм действия которых не предполагает прямого взаимодействия с мРНК мишенями, а связан с рекрутированием белков. Самым известным примером такой нкРНК является 6S РНК, широко распространенная у многих видов бактерий и одна из первых открытых бактериальных регуляторных РНК [49]. 6S РНК регулирует транскрипцию путем взаимодействия с холоферментом РНК-полимеразы, ассоциированной с сигма-фактором 70 (также известного, как сигма-фактор «домашнего хозяйства») [50]. Это взаимодействие происходит преимущественно в стационарной фазе роста и подавляет транскрипцию всех генов, находящихся под контролем сигма-фактора 70. Изменение паттерна экспрессии генов, происходящее вследствие этого процесса, приводит к адаптации бактерии к новым условиям и способствует выживанию. У некоторых бактерий также показан вклад 6S РНК в процесс споруляции [51]. Еще одной интересной особенностью 6S является то, что она может служить матрицей для синтеза еще одного типа коротких (менее 30 нуклеотидов) нкРНК, получившего название «пРНК» [52]. Предполагается, что пРНК могут участвовать в механизме освобождения 6S РНК из комплекса, образованного с РНК-полимеразой [53], однако описание точного механизма их действия требует дополнительных исследований. Предполагаемая модель действия 6S РНК схематично изображена на Рисунке 4.

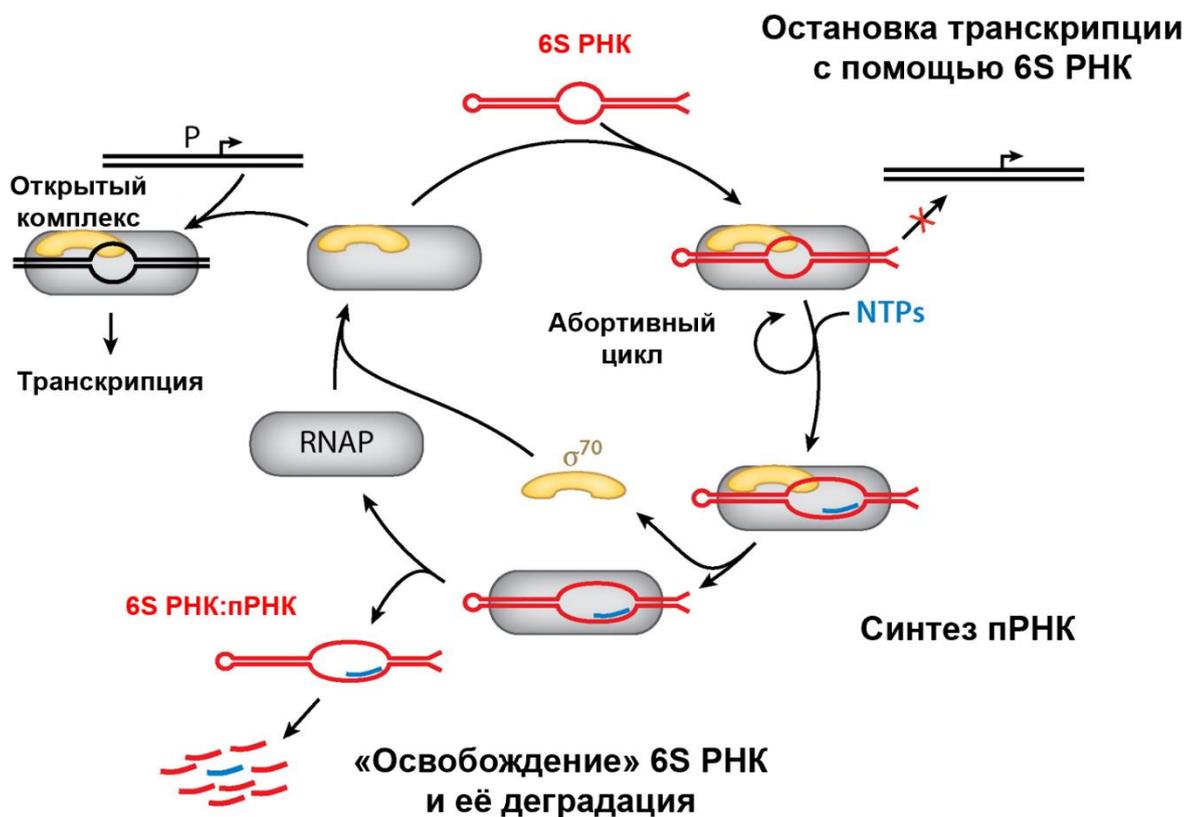


Рисунок 4 – Модель действия 6S РНК *E. coli*; адаптировано из [54]

Малые РНК из семейства CsrV являются еще одним примером нкРНК, действующих путем секвестрации белков [55]. Гомологи CsrV-подобных РНК распространены среди многих эубактерий и участвуют в глобальном контроле разнообразных процессов, включающих углеродный метаболизм, образование биопленок, патогенез, секрецию различных молекул и т.д. Семейство нкРНК CsrV содержит множество сайтов связывания регуляторного белка CsrA. В форме димера этот белок способен взаимодействовать с сайтами посадки рибосом, тем самым ингибируя трансляцию [56]. Малые РНК семейства CsrV секвестируют CsrA, выступая в роли его антагониста. CsrA также обладает ауторегуляторным механизмом, т.к. способен косвенно активировать транскрипцию CsrB [57]. Описано большое количество Csr систем подобного типа, но в основе действия всех них лежит принцип секвестрации регуляторного белка. Приведенный выше механизм является еще одним примером того, как малая РНК может выступать в роли глобального мастер-регулятора и контролировать сразу большое количество независимых друг от друга процессов.

РНК-губки (RNA sponges). Малые некодирующие РНК могут участвовать в регуляции не только мРНК, но и других нкРНК. Такие регуляторные РНК называются «РНК-губками», а их основная функция заключается в модуляции активности других нкРНК путем их секвестрации.

Одним из примеров контроля экспрессии с помощью таких РНК-губок является регуляция активности вышеописанной нкРНК GcvB, участвующей в аминокислотном метаболизме. Активность GcvB контролируется с помощью двух РНК-губок – SroC и AgvB [58]. Малая РНК AgvB кодируется в гене бактериофага и способна связываться с нкРНК GcvB, напрямую конкурируя с её мишенями. Подобная секвестрация GcvB с помощью избытка AgvB приводит к повышению экспрессии гена *dppA*. Этот ген кодирует периплазматический связывающий компонент АВС-транспортера, и его мРНК является одной из важнейших мишеней GcvB. Ещё одна РНК-губка, SroC, может взаимодействовать с определёнными участками GcvB и также активировать её деградацию, уменьшая доступную концентрацию GcvB для её собственных мишеней [59]. Так как GcvB является мастер-регулятором нескольких мРНК, то и контроль её активности с помощью SroC выражается в изменении экспрессии генов целого регулона (Рисунок 5).

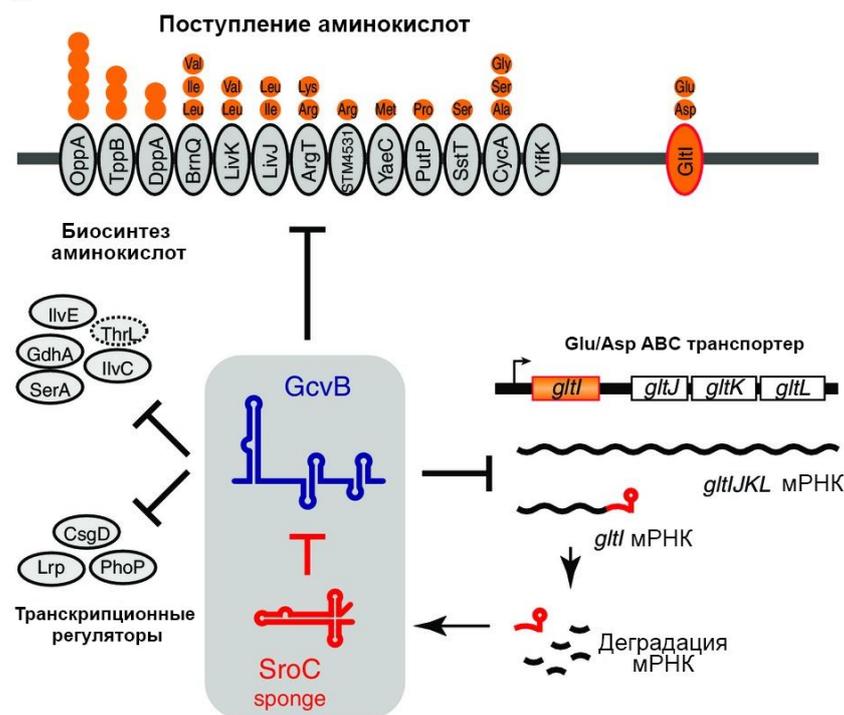


Рисунок 5 – Схематичное изображение механизма контроля нкРНК GcvB *S. enterica* с помощью РНК-губки SroC; адаптировано из [59]

Стоит подчеркнуть, что транскрипция РНК-губок может регулироваться и их собственными нкРНК-мишенями, создавая таким образом цикл обратной связи. Примером такой системы является контроль активности нкРНК ChiX, вовлеченной в регуляцию экспрессии генов,

продукты которых необходимы бактериям рода *Salmonella* для утилизации хитоолигосахарида хитобиозы [60]. В отсутствие индуктора, нкРНК ChiX и регулируемый ею оперон *chiPQ*, транскрибируются конститутивно. Взаимодействие ChiX и мРНК *chiPQ* стимулирует деградацию бицистронного транскрипта при помощи РНКазы E, ингибируя синтез ChiP. В присутствии хитоолигосахаридов, индуктор связывается с транскрипционным фактором ChbR, что активирует его и стимулирует транскрипцию оперона *chb*. Последующий процессинг мРНК *chb* с помощью РНКазы E приводит к созреванию РНК-губки *chbBC ICR*, которая выщепляется из интерцистронной области родительского транскрипта. Взаимодействие этой РНК-губки с нкРНК ChiX подавляет активность последней, что ослабляет негативный контроль экспрессии хитопорина ChiP. Сборка ChiP на внешней мембране усиливает поступление хитоолигосахаридов, что в свою очередь ещё больше активирует всю систему путём подавления активности ChiX с помощью РНК-губки *chbBC ICR* (Рисунок 6).

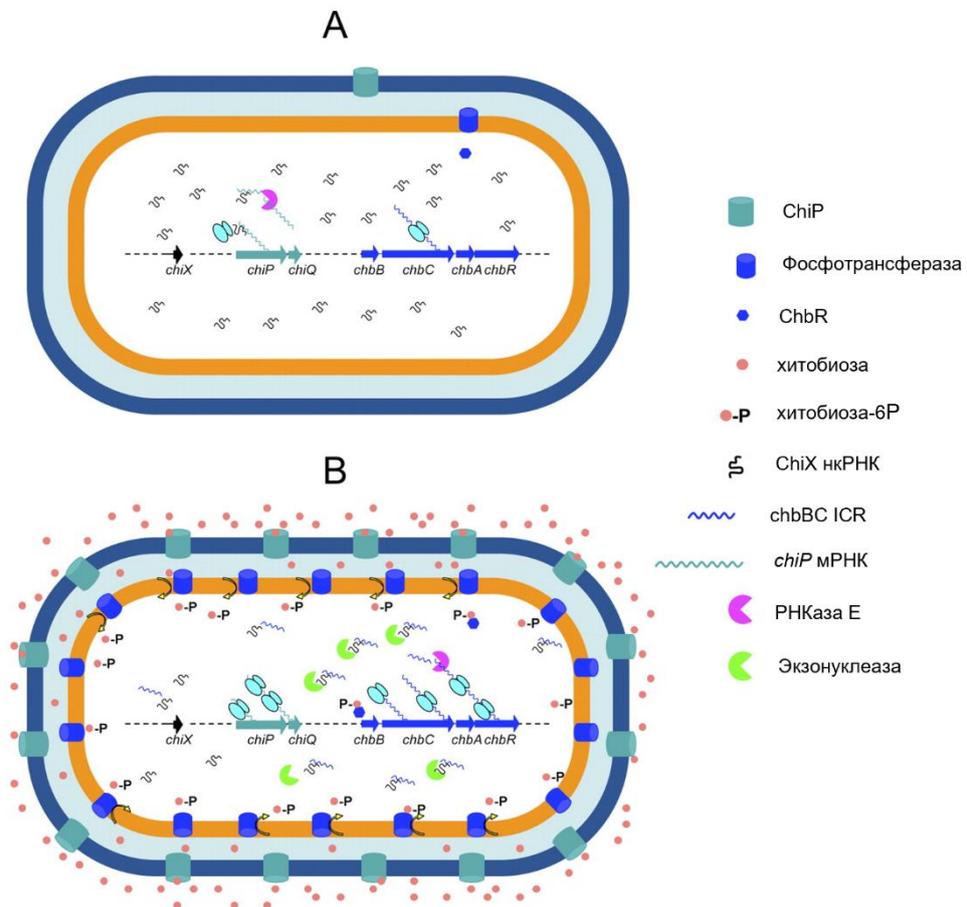


Рисунок 6 – Схематичное изображение регуляции экспрессии ChiP с помощью нкРНК ChiX; (А) Поведение системы в отсутствие индуктора, экспрессии ChiP нет; (Б) Активация экспрессии ChiP в присутствии индуктора (хитобиозы); адаптировано из [60]

Бактериальные нкРНК во взаимодействии бактерий с макроорганизмом. Существует еще один принцип действия бактериальных нкРНК, который находится еще только на ранней стадии изучения, но уже существенно расширил представления о межвидовой коммуникации на уровне транскриптомов. Бактериальные малые РНК способны опосредовать взаимодействие бактерии и организма хозяина, напрямую модулируя экспрессию эукариотических генов (чаще всего связанных с иммунным ответом). Такой тип взаимодействия на данный момент более подробно изучен для патогенных бактерий, однако предполагается, что подобный контроль может осуществляться бактериями-симбионтами и комменсалами.

Впервые подобное взаимодействие было показано для *P. aeruginosa*, оппортунистического патогена, который является возбудителем синегнойной инфекции, одного из самых распространенных госпитальных заболеваний [61]. Коеррен и соавторы продемонстрировали, что в везикулах внешней мембраны, которые секретирует эта бактерия, содержится большое количество нкРНК [62]. Проведя биоинформатический скрининг, который включал в себя оценку стабильности вторичной структуры и поиск потенциальных мишеней среди эукариотических транскриптов, авторы сфокусировали свое внимание на малой РНК sRNA52320. Было продемонстрировано, что в процессе инфекции осуществляется прямой транспорт этой регуляторной РНК в цитоплазму клеток организма-хозяина. Там sRNA52320 подавляет экспрессию IL-8, одного из ключевых провоспалительных интерлейкинов макрофагов, предположительно связываясь с мРНК участников сигнального пути MAPK, активируемого липополисахаридами (Рисунок 7). В свою очередь, это приводит к ослаблению иммунного ответа. Авторы считают, что действие sRNA52320 может напоминать механизмы эукариотических микроРНК, которые ингибируют трансляцию, взаимодействуя с небольшими областями мРНК. Тем не менее, точный молекулярный механизм sRNA52320 еще только предстоит выяснить.

Еще одним интересным вариантом реализации подобного взаимодействия является использование бактерией эукариотических систем процессинга РНК. Это было показано для нкРНК Sal-1 *S. enterica*, функция которой заключается в репрессии синтеза индуцибельной NO-синтазы iNOS [65]. Sal-1 попадает в цитоплазму клетки хозяина в виде транскрипта-предшественника, который, образуя комплекс с белком Argonaute 2, процессируется в зрелую форму, мимикрирующую под эукариотическую микроРНК. Взаимодействие зрелой формы Sal-1 с транскриптом iNOS ингибирует трансляцию NO-синтазы, что, в итоге, снижает продукцию NO и повышает вирулентность патогена. Механизм, по которому Sal-1 транспортируется в клетку организма-хозяина, на данный момент неизвестен.

Не менее важной роль бактериальных нкРНК может быть и в случае симбиотических взаимодействий. Бактерия *Vibrio fischeri* живет в симбиозе с кальмаром *Euprymna scolopes* в специальном «светящемся» органе - фотофоре [66]. Именно бактерии обеспечивают люминесцентное свечение кальмара, что, как считается, играет роль в камуфлировании этого моллюска от хищников. Moriano-Gutierrez и соавторы показали, что малая РНК SsrA *V. fischeri* необходима для описанного симбиотического взаимодействия [67]. Эта нкРНК транспортируется в эпителиальные клетки кальмара в составе везикул и модулирует иммунный ответ хозяина, действуя, предположительно, через рецептор опознавания паттерна RIG-I. Несмотря на то, что штамм *V. fischeri* с делецией гена *ssrA*, также как и родительский штамм, может колонизировать фотофор кальмара, он не способен долгое время персистировать в организме-хозяине. При этом, уровень люминесценции фотофора, колонизированного мутантным штаммом, значительно ниже по сравнению с уровнем люминесценции при колонизации родительским штаммом. Профилирование транскриптома фотофора показало, что в случае колонизации штаммом $\Delta ssrA$ изменяется экспрессия ряда эукариотических генов, включая повышение экспрессии гена лакказы-3. Лакказы-3 – это внеклеточный белок, который вовлечен в синтез меланина и участвует в иммунном ответе у многих беспозвоночных [68]. Авторы полагают, что снижение уровня люминесценции связано именно с лакказой-3, так как этот фермент обладает оксидазной активностью и уменьшает концентрацию кислорода, необходимого для люциферин-люциферазной реакции *V. fischeri* [69]. Делеция гена нкРНК *ssrA* приводит к негативным последствиям как для самой бактерии (снижая её выживаемость в фотофоре кальмара), так и для организма-хозяина, который теряет способность к люминесценции. Детали механизма действия SsrA еще только предстоит изучить, но это первый и очень важный пример, показывающий, что действие бактериальной малой РНК может быть полезным для другого вида. Учитывая необычайное разнообразие и длинную эволюционную историю микробиома человека, можно предположить существование подобных нкРНК и механизмов взаимодействия у составляющих его бактерий.

1.3.2 Участие шаперонных белков в механизмах действия бактериальных нкРНК

Важно отметить, что наиболее подробно механизмы действия транс-кодируемых малых РНК описаны для грамотрицательных бактерий с участием шаперонного белка Hfq. Hfq является гомогексамерным белковым комплексом, представляющим собой тороид с большим количеством РНК-связывающих участков [70]. В его составе выделяют 4 крупных участка: дистальную сторону, проксимальную сторону, латеральное кольцо и внутренний неупорядоченный С-конец (Рисунок 8) [71].



Рисунок 8 – Кристаллическая структура шаперонного белка Hfq *E. coli*; адаптировано из [72]

Каждый из участков обладает средством к определенным нуклеотидным последовательностям РНК. Проксимальная сторона преимущественно связывает последовательности, обогащенные урацилом; дистальная сторона связывает РНК, обогащенные последовательностью ARN (где А – аденин, R – аденин или гуанин, а N – любой нуклеотид), а латеральное кольцо обладает средством к UA-богатым последовательностям. Некодирующие РНК взаимодействуют с проксимальной стороной Hfq при помощи поли(У)-тракта, который образуется при Rho-независимой терминации в процессе транскрипции. Малые РНК, которые связываются с Hfq, подразделяют на два класса: класс I способен взаимодействовать также с латеральным кольцом, а класс II с дистальной поверхностью. Считается, что нкРНК второго класса обладают большей стабильностью, чем нкРНК первого класса [73]. Транскрипты мРНК преимущественно взаимодействуют с дистальной и латеральной поверхностями Hfq. Hfq, таким образом, выступает в качестве площадки, облегчающей взаимодействие нкРНК и их РНК

мишеней на нескольких этапах: сближая обе РНК, изменяя их вторичные структуры, нейтрализуя отрицательный заряд и стимулируя образование дуплексов.

Стоит отметить, что С-конец Hfq, который варьирует по своей длине и последовательности у различных видов бактерий, также принимает участие в регуляции взаимодействия нкРНК с их мРНК мишенями. Было показано, что С-конец способен вытеснять двуцепочечные РНК с латеральной и проксимальной поверхностей Hfq, что способствует повторному использованию комплекса [74].

Hfq является наиболее изученным, но не единственным белком-шапероном, участвующим в механизмах действия транс-кодируемых нкРНК бактерий. Интерес многих научных групп на данный момент сосредоточен на изучении шаперонного белка ProQ, который содержит РНК-связывающий домен FinO. ProQ, как и Hfq, является глобальным РНК-связывающим белком, который опосредует большое количество взаимодействий между малыми РНК и их мРНК мишенями. Эксперименты по ко-иммунопреципитации ProQ в *S. enterica* показали, что этот белок связывает сотни РНК-лигандов [75]. Анализ интерактома ProQ показал, что этот белок имеет отличную от Hfq роль, несмотря на небольшое пересечение в списках их РНК партнеров [76]. ProQ преимущественно связывает мРНК, а участок связывания транскриптов смещен к 3'-концу, что отличает ProQ от Hfq, связывающего мРНК преимущественно в 5'-НТО [77]. Ещё одним отличием ProQ является его повышенная специфичность к более структурированным РНК. Тем не менее, функциональные особенности этого шаперона еще плохо изучены и подробный механизм его действия только предстоит открыть.

Роль шаперонных белков в механизмах действия нкРНК у грамположительных бактерий в настоящий момент широко обсуждается. Известно, что у одних бактерий (микобактерии, стрептококки, лактобациллы) гомологов Hfq и ProQ нет. У других (*S. aureus*) делеция гена *hfq* не приводит к заметным изменениям в фенотипе [78; 79]. При этом, гетерологичная экспрессия Hfq *S. aureus* в штамме *B. subtilis* с делецией собственного гена *hfq* не приводит к восстановлению фенотипа, что свидетельствует о том, что роль этого шаперона не во всех бактериях может быть связана с регуляцией нкРНК [80].

Существует предположение о том, что вероятность участия шаперонных белков в механизмах действия малых РНК зависит от ГЦ-состава организма [81]. Согласно этой гипотезе, чем ниже содержание гуанина и цитозина в геноме бактерии, тем менее вероятно участие Hfq во взаимодействии малых РНК и мРНК. Однако, актинобактерии являются очевидным исключением из данного предположения. У этого типа не обнаружено гомологов Hfq, при том, что у некоторых родов актинобактерий (стрептомицеты, микобактерии, франкии) ГЦ-состав доходит до 70%.

Холодошоковые белки представляются возможными кандидатами для исполнения функции РНК-связывающих шаперонов, участвующих в механизмах действия нкРНК.

Холодошоковый белок А (CspA) у *E. coli* является важнейшим белком для адаптации к холодовому стрессу; его роль заключается в дестабилизации вторичных структур РНК при низких температурах [82]. Однако, также было показано взаимодействие гомолога CspA у *S. aureus* с нкРНК в эксперименте по определению интерактома этого белка [83]. Это открытие послужило ключевой предпосылкой в выдвижении гипотезы о том, что CspA может опосредовать взаимодействие между нкРНК и мРНК у некоторых бактерий. В контексте микобактерий эта гипотеза впервые была представлена в обзорной статье Schwenk и Arnvig [84].

У *M. tuberculosis* обнаружено два холодошоковых белка - CspA и CspB. В исследовании 2018 года было показано, что оба этих белка взаимодействуют с кором РНК-деградосомы [85]. Это является косвенным свидетельством того, что эти белки также способны дестабилизировать жесткие вторичные структуры РНК, как их гомологи. Однако, действительно ли CspA способен регулировать активность нкРНК таким образом, каким это делают Hfq и ProQ, еще только предстоит выяснить.

1.4 Ландшафт малых некодирующих РНК микобактерий

Малые некодирующие РНК микобактерий представляют особый интерес как в области фундаментальных, так и прикладных исследований. Как и другие патогенные микроорганизмы, многие виды микобактерий в различных стадиях своего жизненного цикла встречают большое количество стрессирующих факторов, к которым необходимо быстро адаптироваться.

Механизмы действия микобактериальных нкРНК описаны гораздо хуже по сравнению с модельными организмами т.к. микобактерии не обладают известными шаперонными белками Hfq и ProQ [86] и характеризуются высоким ГЦ-составом генома (61-71% для видов, продуцирующих миколовые кислоты) [87]. На данный момент, с использованием технологий секвенирования на микрочипах и массивованного параллельного секвенирования, у микобактерий открыто уже несколько десятков малых некодирующих РНК. Тем не менее, точные молекулярные механизмы, мРНК-мишени и функциональные роли были описаны лишь для нескольких регуляторных РНК.

1.4.1 Хронология аннотации некодирующего транскриптома микобактерий

Исследование нкРНК микобактерий началось в конце 2000-х годов. Одной из первых работ, положивших начало этому направлению, стала публикация 2009 года Arnvig и Young, в

которой было идентифицировано 9 нкРНК *M. tuberculosis* [88]. Авторы использовали секвенирование по Сэнгеру для анализа кДНК библиотек, синтезированных на основе низкомолекулярной фракции РНК, выделенной с помощью гель-электрофореза. Классификация полученных последовательностей позволила аннотировать 4 цис- и 5 транс-кодируемых нкРНК, транскрипция которых была подтверждена *in vivo* с помощью нозерн-блоттинга. Было показано, что гиперэкспрессия некоторых из открытых нкРНК в микобактериях приводит к ярким фенотипическим эффектам. Так, гиперэкспрессия малых РНК B11 и G2 привела к летальному фенотипу в *M. tuberculosis* и сильному замедлению скорости клеточного деления в *M. smegmatis*. Гиперэкспрессия F6 никак не повлияла на фенотип *M. smegmatis*, но в *M. tuberculosis* было отмечено сильное замедление скорости роста штамма. Авторы также впервые продемонстрировали факт изменения транскрипции некоторых микобактериальных нкРНК в ответ на действие стрессов; например, в условиях окислительного стресса у *M. tuberculosis* возрастала транскрипция B11, B5, F6 и ASpks.

В том же году с помощью гибридизации на ДНК-микрочипах было продемонстрирована высокая транскрипция некодирующих областей генома *M. leprae* [89]. Несмотря на то, что авторы не аннотировали отдельные гены нкРНК, это исследование стало первым, в котором был оценен масштаб некодирующего транскриптома микобактерий. Всего было выделено 68 активно транскрибирующихся некодирующих областей генома.

Через год вышла работа DiChiara и соавторов, где, в комбинации с биоинформатическими методами, был использован аналогичный подход для поиска нкРНК у *M. bovis* [1]. Авторы идентифицировали 37 нкРНК, 34 из которых были обнаружены впервые. Наличие гомологов некоторых идентифицированных нкРНК было предсказано у родственных микобактерий, а у *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* они также были экспериментально подтверждены с помощью нозерн-блоттинга.

В 2011 году была опубликована статья, где был впервые применен полнотранскриптомный подход для поиска нкРНК микобактерий на примере *M. tuberculosis* в логарифмической и стационарной фазах роста [90]. Авторы показали, что некодирующие транскрипты составляют существенную фракцию транскриптома *M. tuberculosis* (3,9% и 3,8% от всех картированных последовательностей в экспоненциальной и стационарной фазах роста соответственно) и идентифицировали несколько новых регуляторных РНК. В этой же работе было показано накопление транскриптов некоторых нкРНК (MTS0997, MTS1338, MTS2823) *in vivo* в мышинной модели инфекции, что стало первым экспериментальным свидетельством, указывающим на участие малых РНК микобактерий в патогенезе.

В 2012 году вышла серия, состоящая из 2 работ, посвященная аннотации нкРНК *M. tuberculosis*, авторы которой комбинировали подходы РНК-секвенирования, гибридизации на

ДНК-микрочипах и консервационного анализа [91; 92]. С помощью секвенирования короткой фракции РНК и биоинформатического анализа был отобран набор, состоящий из более чем 1373 кандидатных нкРНК. Затем было проведено профилирование транскрипции этого набора в экспоненциальной фазе роста с использованием ДНК-микрочипов, которое подтвердило существование 258 транскриптов. В соответствии с классификацией, проведенной авторами, было выделено 22 межгенных и 152 антисенс нкРНК, некоторые из которых были подтверждены методом нозерн-блоттинга. В работе также был выполнен анализ канонических регуляторных последовательностей и отмечено, что 60,5% генов аннотированных нкРНК имеют консенсусную последовательность -10 *sigA* в промоторной области, а 22,1% обладают терминаторными участками [91].

Коллектив авторов под руководством Contreras расширил существующую аннотацию некодирующих РНК *M. smegmatis* и *M. bovis* BCG, выделив 17 и 23 новых нкРНК для каждого вида соответственно [2]. Особенностью работы стало использование только биоинформатического алгоритма, разработанного Livny и соавторами [93], для предсказания генов нкРНК. Потенциальные транскрипты были подтверждены методом нозерн-блот. Для определения 5'- и 3'- концов нкРНК применялась комбинация РНК-секвенирования и RACE.

В 2013 году был впервые проведен анализ некодирующего транскрипта возбудителя микобактериоза *M. avium* с помощью метода РНК-секвенирования [94]. Авторы работы выделили 86 цис-кодируемых и 10 транс-кодируемых нкРНК, 6 из которых имели гомологи у других микобактерий. Также была показана зависимость транскрипции двух описанных нкРНК, *igMAV_0468–0469* и *igMAV_0469–0470*, от генетического контекста организма-хозяина при заражении *in vivo*, что говорит об их участии в патогенезе. Данные регуляторные РНК активно транскрибируются только в модели инфекции чувствительных к туберкулезу мышей линии I/St, тогда как при заражении резистентных мышей линии B6, транскрипция этих нкРНК подавляется.

Необычный подход поиска нкРНК был применен в работе Li и соавторов [95]. Авторы гетерологично экспрессировали Hfq *E. coli* в составе химерного белка с FLAG-тэгом в *M. smegmatis*. Затем, при помощи иммунопреципитации с использованием антител к FLAG-тэгу был выделен пул связавшихся с химерным белком РНК и отсеквенирован. После биоинформатического анализа удалось выявить 24 нкРНК (12 цис-, 12- транс-кодируемых); транскрипция каждой из которых была подтверждена с помощью нозерн-блоттинга. Дополнительно был проведен филогенетический анализ и показано существование гомологичных нкРНК у ряда других микобактерий.

Наиболее полное на данный момент профилирование некодирующего транскрипта *M. tuberculosis in vitro* было опубликовано в 2018 году [4]. Авторы методом РНК-секвенирования провели профилирование транскрипта низкомолекулярной фракции РНК *M. tuberculosis* в

условиях действия различных стрессов (обедненная железом среда, SDS, кислотный и окислительный стрессы, недостаток питательных веществ). При этом было выявлено не только 103 новых нкРНК, но и показана динамика их транскрипции в различных условиях, что может быть использовано для характеристики и поиска функций каждой конкретной регуляторной РНК (Рисунок 9).

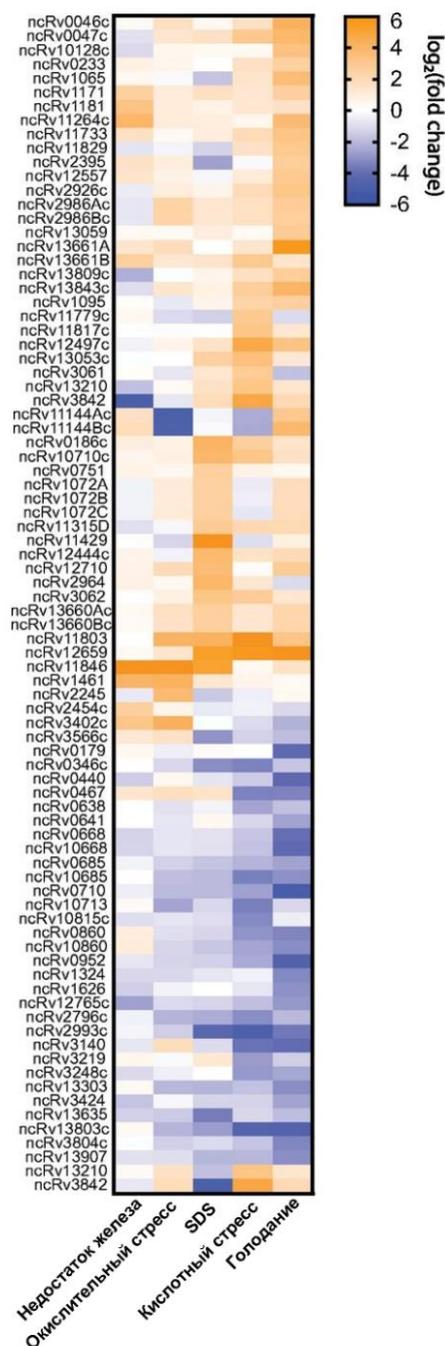


Рисунок 9 – «Тепловая» карта, отображающая изменение транскрипции малых РНК *M. tuberculosis* в различных стрессах; цветом обозначена величина изменения экспрессии конкретного гена; адаптировано из [4]

Ещё одна попытка аннотации малых РНК в *M. tuberculosis*, на основе данных РНК-секвенирования, была предпринята Ozuna и соавторами [96]. В работе был опубликован новый алгоритм поиска малых РНК, названный «baerhunter», а также его сравнение с другими биоинформатическими моделями. Всего было предсказано от 300 до более чем 1000 нкРНК, большая часть которых подтверждалась экспериментальными данными по картированию сайтов старта транскрипции *M. tuberculosis*. Верификация истинных малых РНК из этого массива данных потребует долгой и скрупулезной работы, тем не менее эти результаты показывают, что количество нкРНК в геноме отдельного вида микобактерий, по всей видимости, приближается к нескольким сотням.

Стоит также обратить внимание на работы, посвященные поиску микобактериальных нкРНК в условиях заражения *ex vivo*. В 2021 было опубликовано исследование, в котором производился анализ некодирующего транскриптома *M. tuberculosis* и *M. bovis* BCG в условиях заражения культуры моноцитов THP-1 [3]. В работе было обнаружено 490 нкРНК в *M. bovis* и 390 нкРНК в *M. tuberculosis*, причем более 96% всех РНК были аннотированы впервые. Авторы работы показали, что паттерны транскрипции нкРНК зависят от того, были бактерии поглощены макрофагами (внутриклеточная популяция) или ко-культивировались в одной среде (внеклеточная популяция): для каждой из групп бактерий был описан свой уникальный набор регуляторных РНК. Кроме того, для *M. tuberculosis* было продемонстрировано преобладание транскрипции антисенс нкРНК, а для *M. bovis* – межгенных транскриптов. Функциональный анализ и *in silico* поиск мишеней показали ассоциацию большого количества нкРНК с липидным метаболизмом и процессами образования биопленок.

В результате многочисленных исследований, проведенных за последние 15 лет, удалось сформировать представление о репертуаре микобактериальных нкРНК и их значимости в различных биологических контекстах. Более того, с каждым годом растет как число открытых нкРНК, так и массив данных, свидетельствующих об их важной роли в жизни микобактерий.

Разносторонний анализ нкРНК в микобактериях выявил их участие в сложных регуляторных сетях, влияющих на экспрессию генов и способствующих адаптации бактерий. Идентификация регуляторных РНК, связанных с действием различных стрессирующих факторов и процессами инфекции подчеркивает их потенциал в качестве ключевых компонентов в ответе микобактерий на меняющиеся условия окружающей среды.

1.4.2 Примеры микобактериальных малых РНК

Для почти всех известных микобактериальных нкРНК характерен механизм репрессии экспрессии их мРНК мишени путем образования РНК-РНК дуплекса с небольшой областью регулируемого транскрипта. При этом, отсутствие у микобактерий известных шаперонных белков, участвующих в классических схемах действия малых РНК, поднимает вопрос об универсальности этих механизмов и является важной темой для будущих исследований. Ниже будут рассмотрены несколько примеров наиболее полно охарактеризованных микобактериальных регуляторных РНК, для которых была показана функция *in vivo* и доказана их молекулярная мишень.

Mcr7. Mcr7 – это первая малая РНК *M. tuberculosis*, для которой была установлена функция [97]. Эта нкРНК имеет длину ~350 нуклеотидов и характерна для всех видов туберкулезного комплекса, представители которого патогенны для человека и животных. Авторы обнаружили, что Mcr7 не транскрибируется в штаммах *M. tuberculosis*, имеющих делецию гена *phoP*. PhoP представляет собой один из белков двухкомпонентной системы PhoPR, которая контролирует экспрессию большого количества генов, связанных с вирулентностью [98]. Ген малой РНК был установлен в результате эксперимента ChIP-seq по поиску сайтов ДНК, которые связывает PhoP. Применяв биоинформатический анализ, авторы выявили потенциальные мРНК мишени, с которыми может взаимодействовать 33-нуклеотидная петля, находящаяся в составе вторичной структуры Mcr7. Пересечение предсказанных мишеней с биологическими данными, которые показывали, что мутанты по гену *phoP* также характеризовались нарушением секреции с использованием трансмембранной системы Tat, позволило выявить молекулярную мишень Mcr7 – транскрипт гена *tatC*. Система Tat, в частности, необходима для секреции антигенов комплекса Ag85, вовлеченных в связывание фибронектина и участвующих в процессе клеточной инвазии [99; 100]. Mcr7 образует РНК-РНК дуплекс с предсказанным сайтом посадки рибосом и первыми 6-ю кодонами мРНК *tatC*, что ингибирует трансляцию этого транскрипта. Таким образом, малая РНК Mcr7 представляет собой регуляторное звено, связывающее транскрипционный фактор PhoP и секрецию различных компонентов, участвующих в патогенезе. Механизм действия Mcr7 изображен на Рисунке 10.

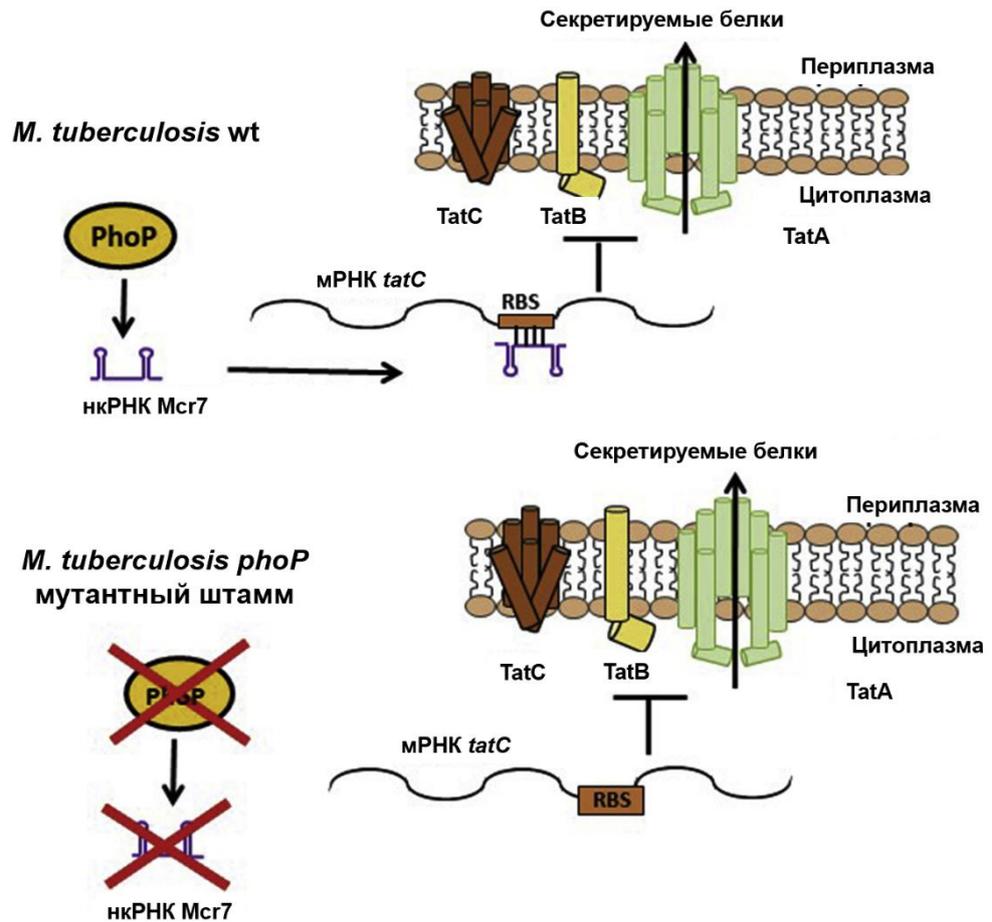


Рисунок 10 – Схематичное изображение механизма действия нкРНК *M. tuberculosis* Mcr7; адаптировано из [5]

V11 (6C). Ген регуляторной РНК 6C был впервые предсказан у ГЦ-богатых бактерий, в том числе и микобактерий, на основе гомологии геномных последовательностей [101]. Название 6C происходит от шести остатков цитозина, находящихся в консервативной вторичной структуре нкРНК «петля-стебель». Позднее транскрипция этой малой РНК в *M. tuberculosis* была подтверждена экспериментально [88] и переименована в V11. Было показано, что гиперэкспрессия этой малой РНК в *M. smegmatis* вызывает сильное снижение скорости роста бактерии, а в *M. tuberculosis* приводит к нежизнеспособному фенотипу. В 2019 году Mai и соавторы детально охарактеризовали V11 *M. tuberculosis*, используя в качестве модели *M. smegmatis* [86]. Профилирование транскриптома при индуцибельной транскрипции V11 в *M. smegmatis* методом РНК-секвенирования позволило выявить гены, которые начинают дифференциально экспрессироваться при гиперэкспрессии этой малой РНК. С помощью биоинформатического алгоритма была произведена оценка способности к взаимодействию V11 с мРНК транскриптом каждого дифференциально экспрессированного гена и отобран список из 47 потенциальных мРНК мишеней. С помощью специально сконструированной репортерной

системы авторы подтвердили, что 15 случайно выбранных из отобранного списка генов действительно негативно регулируются при гиперэкспрессии B11. Наблюдаемый при этом фенотип (сильное замедление скорости роста) авторы связали с репрессией гена ДНК-хеликазы *dnaB*. Искусственное снижение концентрации транскрипта *dnaB* в клетке при помощи системы CRISPR-интерференции вызвало такое же замедление роста и удлинение клеток, как и гиперэкспрессия B11. Несмотря на большой массив экспериментальных данных, физиологическая роль этой малой РНК в *M. tuberculosis* остается не до конца ясной, а попытки создать делеционный мутант по гену B11 не увенчались успехом.

Гомолог B11 был также изучен у патогенного вида *M. abscessus*, штамм с делецией гена этой малой РНК которого удалось создать [102]. Было показано, что делеция гена малой РНК B11 приводит к повышению вирулентности штамма и увеличивает продукцию ряда цитокинов в контексте инфекции. Транскриптомное профилирование выявило, что B11 негативно регулирует экспрессию более 200 генов, в том числе генов системы секреции ESX-4, которая играет важную роль в патогенезе *M. abscessus*. Контроль экспрессии одного из компонентов ESX-4, гена *eccB4* был подтвержден с помощью специально созданной репортерной системы: B11 взаимодействует с мРНК *eccB4* в области сайта связывания рибосом, останавливая трансляцию. Таким образом, B11 в *M. abscessus* выполняет роль негативного регулятора вирулентности.

MrsI. Одним из важнейших стрессирующих факторов, к которым внутриклеточные патогены должны адаптироваться во время инфекции, является ограничение доступности ионов железа [103]. MrsI - малая некодирующая РНК *M. tuberculosis*, транскрипция которой сильно возрастает при выращивании культуры на среде с недостатком ионов железа, участвует в адаптации к этому состоянию [4]. Делеция гена *mrsI* приводит к повышению экспрессии целого ряда генов, участвующих в метаболизме железа. С помощью биоинформатического анализа среди этих генов была выявлена кандидатная мишень - бактериоферритин *bfrA*, что было экспериментально подтверждено с помощью специально сконструированной репортерной системы. Таким образом, MrsI напрямую ингибирует экспрессию гена *bfrA*, влияя на паттерн метаболизма железа. В конечном итоге, это позволяет бактерии быстрее адаптироваться к недостатку ионов этого металла. Вторичная структура MrsI и её функциональный домен изображены на Рисунке 11.

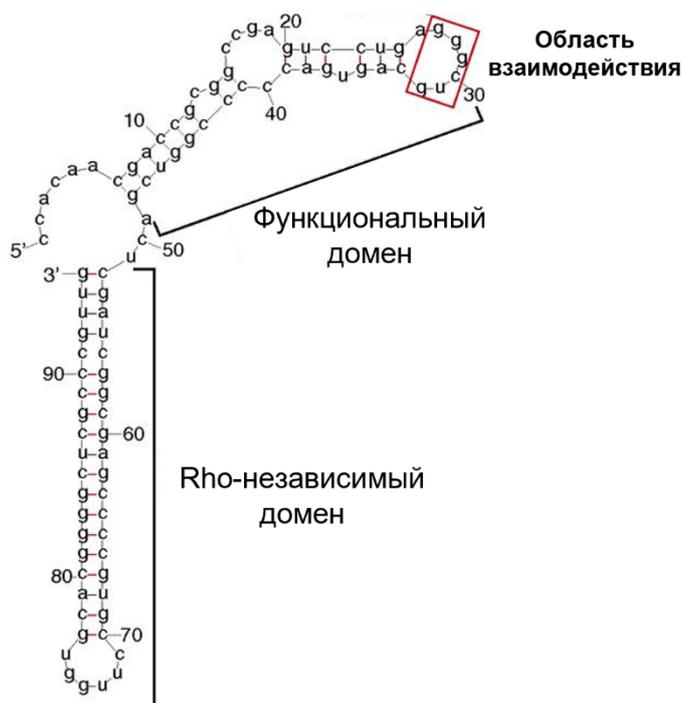


Рисунок 11. Вторичная структура малой РНК MrsI; взаимодействующий с мРНК мишенью участок выделен красной рамкой; адаптировано из [4]

MTS2823 (Ms1). MTS2823 выделяется среди других известных микобактериальных нкРНК своим необычным механизмом действия. Эта малая РНК характеризуется активной транскрипцией у *M. tuberculosis* в модели мышинной инфекции [104] и консервативной среди всех микобактерий вторичной структурой. MTS2823 является гомологичной вышеописанной 6S РНК (Глава 1.3.1), функция которой в *E. coli* связана с регуляцией генов, находящихся под контролем сигма-фактора 70 [50]. Hnilikova и соавторы определили, что MTS2823 также взаимодействует с коровым ферментом РНК-полимеразы, но, в отличие от большинства других видов бактерий, для этого не требуется участия сигма-фактора [105]. В исследовании, опубликованном в 2019 году, было показано, что MTS2823 является самой представленной нерибосомной РНК в стационарной фазе роста у *M. smegmatis* [106]. Транскрипция MTS2823 также возрастает в условиях этанольного стресса и голодания. Авторы полагают, что основной функцией Ms1 является «консервация» пула кор-фермента РНК-полимеразы во время неблагоприятных условий. Сохранение этого пула позволяет быстро возобновить транскрипцию, когда бактерия снова попадает в благоприятные условия. Последние данные показывают, что MTS2823 характеризуется специальной модификацией – 5' конец этой нкРНК содержит кэп в виде окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) [107]. По всей видимости, эта

модификация ответственна за повышенную стабильность MTS2823, которая наблюдается в стационарной фазе роста.

1.5 Заключение

Описанные данные подчеркивают многообразие и сложность механизмов, с помощью которых некодирующие РНК участвуют в регуляции генной экспрессии в бактериях, в частности, в *M. tuberculosis*. Являясь важнейшим элементом адаптации к меняющимся условиям, нкРНК представляют собой перспективную терапевтическую мишень, которая может быть использована для диагностики и лечения туберкулеза. Изучение нкРНК также имеет важное значение и для фундаментальной науки: исследование этих молекул способствует расширению нашего понимания сложной регуляторной сети, которая определяет жизнедеятельность бактерий.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Используемые бактериальные штаммы, культивирование и условия роста

Mycobacterium smegmatis. Во всех проведенных экспериментах с *M. smegmatis* использовали штамм *M. smegmatis* MC2 155, который был получен из коллекции Института биохимии имени А.Н. Баха РАН; все рекомбинантные штаммы были получены на его основе. В качестве стандартной среды для культивации *M. smegmatis* использовали питательную среду Nutrient Broth (HiMedia, Индия) с добавлением 0,05% детергента Tween 80 (Sigma Aldrich, США). Для приготовления твердой среды в неё добавляли 1,5% агара (Difco, Нидерланды). При применении других сред культивации этой бактерии подробности указаны в описании соответствующих экспериментов.

Для получения культуры *M. smegmatis* в жидкой питательной среде, штамм засеивали в 5 мл стерильной среды и растили в течение 24–48 часов в орбитальном шейкере (200 об/мин) при 37°C. Полученную культуру использовали для вторичного посева в стерильную питательную среду в соотношении 1:100. Инкубацию культуры продолжали при 37°C при постоянном перемешивании (200 об/мин) до достижения необходимой фазы роста. Для культивации рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* в питательную среду добавляли соответствующий антибиотик.

Mycobacterium tuberculosis. Во всех проведенных экспериментах с *M. tuberculosis* использовали штамм *M. tuberculosis* H37Rv, который был получен из коллекции Института биохимии имени А.Н. Баха РАН; все рекомбинантные штаммы *M. tuberculosis* были получены на его основе. Эксперименты с заражением мышей *in vivo* и культур перитонеальных макрофагов *ex vivo* проводили на базе Центрального научно-исследовательского института туберкулёза, все остальные эксперименты с культурами *M. tuberculosis* проводили в Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН. В качестве стандартной среды для культивации *M. tuberculosis* использовали питательную среду Sauton (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% ростовой добавки альбумин-декстроза-каталаза (HiMedia, Индия) и 0,05% Tween 80. Для приготовления агаризованной среды в неё добавляли 1,5% агара. При применении других сред культивации этой бактерии подробности указаны в описании соответствующих экспериментов.

Первичный посев проводили в 5 мл жидкой среды и культивировали 7 суток при 37°C в орбитальном шейкере (200 об/мин). Полученную культуру использовали для вторичного посева в стерильную питательную среду, инкубацию продолжали при 37°C в орбитальном шейкере (200

об/мин) до достижения необходимой фазы роста. Для культивации рекомбинантных штаммов в питательную среду добавляли соответствующий антибиотик.

Escherichia coli. Для всех промежуточных генно-инженерных работ использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (Евроген, Россия). В качестве стандартной среды для культивации *E. coli* применяли жидкую питательную среду LB (Sigma-Aldrich, США) или LB-агар. Культивацию в жидкой среде проводили при 37°C в орбитальном шейкере (200 об/мин) в течение 12–16 часов.

2.2 Оценка оптической плотности бактериальной культуры

Для оценки роста бактериальной культуры 1 мл культуры в жидкой питательной среде помещали в стерильную одноразовую акриловую кювету (Sarstedt, Германия) и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм с помощью спектрофотометра UNICO 2100 (UNICO, США). Для калибровки прибора использовали стерильную питательную среду, аналогичную по составу той, в которой выращивали данную бактериальную культуру. Все измерения проводили в технических трипликатах.

2.3 Выделение нуклеиновых кислот

Тотальная РНК. Бактериальные культуры, выращенные до требуемой фазы роста, центрифугировали (4°C, 4000 об/мин, 10 мин) и удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл реагента TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, США), помещали в 2 мл пробирку, добавляли 0,1 мм циркониевые шарики (BioSpec Products, США) и гомогенизировали с помощью прибора BeadBeater (BioSpec Products, США). В случае экстракции тотальной РНК из легких мышей или культур макрофагов, шаг гомогенизации проводили аналогичным образом.

Полученный гомогенат центрифугировали для осаждения клеточного дебриса (4°C, 12000 g, 2 минуты), супернатант отделяли и переносили в 2 мл пробирку. После этого добавляли 200 мкл хлороформа (Химмед, Россия) и центрифугировали (4°C, 12000 g, 15 минут). Водную фазу переносили в 2 мл пробирку, добавляли половинный объем фенола (рН 5,0) и интенсивно перемешивали. После этого добавляли объем хлороформа, равный объему добавленного фенола, перемешивали и центрифугировали (4°C, 12000 g, 15 минут). Весь цикл повторяли 3 раза, после чего водную фазу переносили в 1,5 мл пробирку, смешивали с равным объемом изопропанола (Химмед, Россия) и инкубировали на льду 40 минут. Затем центрифугировали (4°C, 12000 g, 40

минут), супернатант отбирали, осадок осторожно промывали 500 мкл охлажденного 80% этанола. Центрифугировали (4°C, 12000 g, 30 минут), супернатант удаляли и 5-10 минут подсушивали на воздухе. Полученный осадок растворяли в 10-30 мкл деионизированной воды.

После выделения РНК обрабатывали ДНКазой TurboDNase (Thermo Fisher Scientific, США) для удаления следовых количеств геномной ДНК в соответствии с протоколом производителя. Чистоту и концентрацию выделенной РНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США).

Фракция коротких РНК. Пробы тотальной РНК смешивали с равным объемом буфера RNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США) и денатурировали при 70°C в течение 5 мин. Далее пробы охлаждали на льду и проводили электрофорез в соответствии с протоколом [108] в денатурирующем 15% полиакриламидном геле, содержащем мочевины в концентрации 7М. После окончания электрофореза гель вымачивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) для визуализации РНК и аккуратно вырезали область, содержащую фракцию нкРНК (30-500 нуклеотидов) при помощи скальпеля. Фрагмент вырезанного геля помещали в 2 мл пробирку, добавляли 1,3 мл 0,3 М раствора NaCl и инкубировали при 37°C в течение 12 часов. Затем пробы центрифугировали и отбирали супернатант в чистую 2 мл пробирку. Элюированную РНК выделяли из раствора фенол-хлороформным методом с последующим спиртовым осаждением в соответствии с протоколом, описанным для тотальной РНК.

Геномная ДНК. Бактериальные культуры, выращенные до логарифмической фазы роста, центрифугировали (4°C, 12000 g, 2 минуты), супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера (100 мМ NaCl, 50 мМ Tris HCl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, РНКаза А (в финальной концентрации 200 мкг/мл) (Thermo Fisher Scientific, США)) и переносили в 2 мл пробирку. К суспензии добавляли 0,1 мм циркониевые шарики и лизировали при помощи гомогенизатора BeadBeater. Полученный гомогенат центрифугировали (4°C, 12000 g, 2 минуты), супернатант отделяли и переносили в 2 мл пробирку. К лизату добавляли SDS (финальная концентрация 1%), 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) (SibEnzyme, Россия) и инкубировали 2 часа при 55 °С. После этого к добавляли объем фенола (pH 8,1), равный половине объема лизата, такой же объем хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали (4°C, 12000 g, 15 минут). Водную фазу отбирали в 2 мл пробирку, добавляли равный объем хлороформа, интенсивно перемешивали, центрифугировали (4°C, 12000 g, 15 минут) и водную фазу переносили в 1,5. мл пробирку. К экстрагированной ДНК добавляли 0,1 объема 3 М ацетата натрия (pH 5,2), равный объем изопропанола и инкубировали на льду 1 час. Затем центрифугировали (4°C, 12000 g, 30 минут), супернатант отбирали, осадок осторожно промывали 70% этанолом и 5-10 минут подсушивали на воздухе. Полученный осадок растворяли в 10-30 мкл деионизированной воды.

Плазмиды. Колонии с чашек Петри, прошедшие необходимую селекцию, переносили в пробирки, содержащие по 5 мл питательной среды LB с соответствующим селективным антибиотиком, и инкубировали от 12 до 18 часов на микробиологической качалке (200 об/мин, 37°C). Затем клетки центрифугировали (1700 g, 1 мин) и производили выделение плазмид из осажденной культуры при помощи набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию выделенной плазмиды оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C.

2.4 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в геле

Смесь общим объемом 8 мкл, содержащую 2 мкл буфера для нанесения Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Россия) и 6 мкл смеси амплификации, а также маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия) или 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) общим объемом 7 мкл, наносили на агарозный гель (от 0,5–2% в зависимости от предполагаемой длины разделяемых нуклеиновых кислот), содержащий бромистый этидий в концентрации 1 мкг/мл, помещенный в камеру, заполненную 0,5-кратным трис-боратным буфером. Электрофорез проводили при напряжении 100 В в течение 40-60 минут. Нуклеиновые кислоты в геле визуализировали с помощью трансиллюминатора для электрофореза, объединённого с системой видеозахвата G:box (Syngene, Великобритания). Выделение продуктов амплификации из геля проводили с помощью коммерческого набора Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя.

2.5 Рестрикция и модификация нуклеиновых кислот

Все реакции рестрикции нуклеиновых кислот проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции XbaI, BamHI, HindIII, DraI, EcoRI или PacI производства Thermo Fisher Scientific (США) в соответствии с протоколами производителя.

Достройку или гидролиз выступающих одноцепочечных фрагментов ДНК выполняли с помощью T4 ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США).

Все реакции лигирования были выполнены с использованием T4 ДНК лигазы (Thermo Fisher Scientific, США).

Фосфорилирование и дефосфорилирование 5'-концов ДНК выполняли с помощью T4 полинуклеотид киназы (Thermo Fisher Scientific, США) и фермента Antarctic Phosphatase (NEB, США) соответственно.

2.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Смесь общим объемом 25 мкл, содержащую 16,25 мкл деионизированной воды, по 1,25 мкл каждого праймера (прямой и обратный) в концентрации 10 мкМ, 1 мкл матрицы (до 10 нг ДНК), 0,25 мкл полимеразы высокой точности Q5[®] (0,02 Ед/мкл в финальной концентрации) (NEB, США) и 5 мкл реакционного буфера 5X Q5[®] (NEB, США) подвергали амплификации в приборе для ПЦР PTC-200 (MJ Research Inc.) по следующей программе:

шаг 1: 98°C – 30 секунд (начальная денатурация)

шаг 2: 98°C – 10 секунд (денатурация)

шаг 3: 50–72°C – 15 секунд (отжиг при специфичной для данной пары олигонуклеотидов температуре)

шаг 4: 72°C – 25 секунд на каждые 1000 п.н. (элонгация)

шаг 5: 72°C – 2 минуты (финальная элонгация)

Шаги 2-4 повторяли последовательно 25–30 циклов, в зависимости от сложности матрицы. В случае ГЦ-богатых матриц в общую реакционную смесь добавляли 5 мкл реактива Q5[®] High GC Enhancer (NEB, США).

Подбор температуры отжига праймеров осуществляли с помощью онлайн-программы NEB Tm Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/>). Анализ вторичных структур подобранных олигонуклеотидов и вероятность образования праймер-димеров проводили с помощью веб-сервиса OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Синтез всех используемых в работе олигонуклеотидов был произведен компанией Евроген (Россия); список всех олигонуклеотидов приведет в приложении А.

Очистку полученных фрагментов проводили с помощью коммерческого набора Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя.

ПЦР-скрининг колоний проводили с помощью готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

2.7 Синтез кДНК и ОТ-ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

Для оценки транскрипции отдельных генов использовали метод количественной ПЦР, сопряженный с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для этого из 1 мкг тотальной РНК синтезировали кДНК с использованием гексануклеотидов со случайной последовательностью (Евроген, Россия) и обратной транскриптазы SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

Для проведения количественной ОТ-ПЦР использовали синтезированную кДНК в качестве матрицы, специфичные для каждого гена олигонуклеотиды и смесь для ПЦР qPCRmix-NS SYBR (Евроген, Россия). Амплификацию проводили в системе LightCycler[®] 96 Real Time PCR System (Roche, Швейцария). Протокол амплификации состоял из 40 циклов, каждый из которых включал 3 шага: денатурацию (95°C на протяжении 20 сек), отжиг праймеров (60°C на протяжении 20 сек), и элонгацию (72°C на протяжении 30 сек). После завершения всех циклов проводилась полная денатурация продукта путем нагрева до 98°C. Для каждого эксперимента были использованы 3 биологических и 9 технических репликатов. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения LightCycler96 (Roche, Швейцария) и программу LinRegPCR v2018,3 (Heart Failure Research Center, Нидерланды). Для нормирования данных бактериальных транскриптов использовали транскрипцию гена 16S рРНК, эукариотических – транскрипцию гена β -Актина.

2.8 Получение компетентных клеток и трансформация

M. smegmatis. Получение компетентных клеток *M. smegmatis* и трансформацию проводили в соответствии с протоколом, описанным R. Goude и T. Parish [109].

Культивируемый штамм *M. smegmatis* растили до средней логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0,8-1,0$) в объеме 100–300 мл, затем инкубировали на льду 90 минут и центрифугировали (4°C, 3000 g, 10 мин). Клеточный осадок трижды промывали 10% раствором глицерина (Sigma-Aldrich, США) и ресуспендировали в объеме от 2 до 6 мл 10% раствора глицерина. Полученную суспензию делили на аликвоты по 200 мкл и замораживали до дальнейшего использования.

Для проведения трансформации пробирку с компетентными клетками размораживали на льду, добавляли 0,5–5 мкг плазмиды, которую предварительно растворяли в деионизированной воде в объеме до 5 мкл, переносили в кюветы для электропорации (Bio-Rad, США) и проводили электропорацию при помощи прибора Gene Pulser Xcell Total System (Bio-Rad, США).

Используемые настройки: напряжение 2,5 кВ, электрическая ёмкость 25 мкФ, сопротивление 1000 Ом. После этого клетки инкубировали на льду 10 минут, переносили в 5 мл жидкой питательной среды и инкубировали в орбитальном шейкере (200 об/мин) при 37°C в течение 2 часов. Затем культуры центрифугировали (4°C, 3000 g, 10 мин) и высевали на чашки Петри с селективной агаризованной питательной средой. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C в течение 3–5 дней до появления колоний.

M. tuberculosis. Получение компетентных клеток *M. tuberculosis* и трансформацию проводили в соответствии с протоколом Parish и Stoker [109] и почти аналогичным протоколу для *M. smegmatis*, который был описан выше. Отличия заключались в том, что культуру *M. tuberculosis* не инкубировали на льду на начальном этапе; инкубацию в жидкой среде после электропорации проводили 24 часа и последующая инкубация на твердой питательной среде длилась 3–4 недели.

E. coli. Компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) размораживали на льду, добавляли 5 мкл реакционной смеси лигирования, перемешивали и инкубировали на льду 40 минут. Трансформацию осуществляли путём «термического» шока, на 45 секунд помещая клетки в термостат на 42°C. После этого клетки вновь инкубировали на льду 10 минут, добавляли 800 мкл стерильной среды LB и инкубировали в ротационном шейкере (300 об/мин) 1 час при 37°C. Затем культуру центрифугировали (1700 g, 1 мин), отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в 100 мкл жидкой среды. Полученную суспензию высевали на агаризованную питательную среду с добавлением селективного антибиотика и инкубировали 12–16 часов в термостате при 37°C.

2.9 Создание штамма *M. smegmatis* с делецией гена нкРНК F6 ($\Delta F6$)

Для создания делеционного мутанта *M. smegmatis* по гену малой РНК F6 мы применили двухстадийный метод замены аллеля при помощи генно-инженерной конструкции p2NIL/pGOAL19 (Addgene, США) в соответствии с протоколом, описанным в работе Parish и Stoker [110]. Для этого методом ПЦР амплифицировали фланкирующие ген F6 1,5-кб области ДНК с помощью олигонуклеотидов LNA_F6_F/R и RHA_F6_F/R и лигировали полученный продукт в вектор p2NIL по рестрикционным сайтам BamHI и HindIII с использованием T4 лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Полученную конструкцию рестрицировали по сайту PacI и лигировали с линейаризованным вектором pGOAL19, несущим кассету с селективными генами *sacB* и *lacZ*. Полная схема создания генно-инженерной конструкции представлена в приложении Б.

Итоговой конструкцией (p2NIL_pGOAL19_ΔF6) трансформировали подготовленные клетки микобактерий методом электропорации. Клоны, в которых произошло первое событие рекомбинации (созданный вектор был интегрирован в геном микобактерии) отбирали при помощи селекционной среды, содержащей антибиотики канамицин (50 мкг/мл) (Синтез, Россия) и гиргоницин (20 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США), а также реагент 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-gal, 0,4%) (Boehringer Mannheim, Германия). Для получения клонов, прошедших второе событие рекомбинации, отобранные колонии культивировали 48 часов в 5 мл жидкой питательной среды и затем высевали на агаризованную твердую среду, содержащую сахарозу (2%) и X-gal (0,4%). Отобранные колонии белого цвета проверяли на наличие гена F6 в геноме при помощи метода ПЦР-скрининга бактериальных колоний с использованием олигонуклеотидов F6-KO-check_for и F6-KO-check_rev. Для определения нуклеотидной последовательности полученные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера (Евроген, Россия). Схематичное изображение замены аллеля с помощью конструкции p2NIL_pGOAL19_ΔF6 и этапов селекции *M. smegmatis* приведено на Рисунке 20.

2.10 Создание комплементированного (ΔF6::F6) и контрольного (ΔF6::pMV306) штаммов *M. smegmatis* с делецией гена нкРНК F6

Для комплементации делеции гена нкРНК F6 нами был создан штамм, в геном которого была интегрирована плазида pMV306hsp (Addgene, США) с геном F6 под управлением микобактериального рибосомального промотора *rrnB*. Для этого мы сначала получили вектор pMV306rrnB, заменив область плазмиды pMV306hsp между рестрикционными сайтами XbaI и HindIII, которая содержала промотор *hsp60*, на амплифицированный методом ПЦР с помощью олигонуклеотидов *rrnB_200_xbaI_for* и *rrnB_200_hindIII_rev* промотор гена *rrnB* *M. smegmatis*. Затем, на матрице генома *M. smegmatis*, методом ПЦР амплифицировали последовательность гена F6 с помощью олигонуклеотидов F6_hindIII_for/F6_hindIII_rev и лигировали в линеаризованный по рестрикционному сайту HindIII вектор pMV306rrnB. Правильность собранного фрагмента итоговой конструкции подтверждали секвенированием по методу Сэнгера (Евроген, Россия). В качестве контрольной плазмиды использовали вектор pMV306rrnB. Полная схема создания генно-инженерных конструкций данного этапа представлена в приложении В. Полученными конструкциями (pMV306-F6, pMV306rrnB) трансформировали подготовленные компетентные клетки *M. smegmatis* с делецией гена нкРНК F6 (ΔF6) методом электропорации.

2.11 Создание штаммов *M. smegmatis* для проверки взаимодействия нкРНК F6 и 5'-НТО мРНК MSMEG_4640

Для проверки предсказанного взаимодействия между малой РНК F6 и 5'-НТО мРНК MSMEG_4640 мы создали репортерную систему, состоящую из двух векторов: интегративного (содержавшего репортерный ген *eGFP* соединенный с 5'-НТО MSMEG_4640) и автономного (обеспечивавшего транскрипцию нкРНК F6).

Встраиваемый вектор был разработан на основе плазмиды pMV306, для этого последовательность 5'-НТО MSMEG_4640 амплифицировали с генома *M. smegmatis* с помощью олигонуклеотидов UTR4640-for/UTR4640-rev и лигировали в линейаризованную плазмиду pMV261-GFP (предоставлена Бони И.В., ИБХ РАН) по рестрикционным сайтам XbaI/BamHI. Полученную конструкцию, а также созданный ранее вектор pMV306rrnB расщепляли по рестрикционным сайтам HindIII, достраивали одноцепочечные участки ДНК и лигировали.

Для создания автономного вектора для транскрипции нкРНК F6, мы амплифицировали последовательность гена F6 вместе с промотором *rrnB* и терминатором с помощью олигонуклеотидов rrnB_200_xbaI_for и pMV306_term_xbaI_rev, используя в качестве матрицы созданную ранее плазмиду pMV306rrnB-F6. Итоговый фрагмент лигировали в линейаризованный вектор pAMYC (предоставлен Бони И.В., ИБХ РАН) по рестрикционному сайту XbaI.

Правильность собранных фрагментов обеих конструкций подтверждали секвенированием по методу Сэнгера (Евроген, Россия).

На основе векторов pAMYC-F6 и pMV306-MSMEG4640_{5'utr}-GFP мы создали две производных плазмиды pAMYC-F6mut и pMV306-MSMEG4640_{5'utr}mut-GFP, содержащих по три точечных мутации в изучаемой области взаимодействия. Процесс создания данных векторов описан в Главе 3.2.3. Внесенные мутации были проверены с помощью секвенирования по методу Сэнгера (Евроген, Россия). Полная схема создания векторов pAMYC-F6, pAMYC-F6mut, pMV306-MSMEG4640_{5'utr}-GFP и pMV306-MSMEG4640_{5'utr}mut-GFP приведена в Приложении Г.

Созданные конструкции, в комбинациях, соответствующих вариантам интактного, нарушенного и восстановленного взаимодействия изучаемых последовательностей, последовательно трансформировали в подготовленные компетентные клетки *M. smegmatis* штамма ΔF6 методом электропорации. При этом, сначала трансформировали интегративный вектор (pMV306-MSMEG4640_{5'utr}-GFP или pMV306-MSMEG4640_{5'utr}mut-GFP), содержащий ген устойчивости к канамицину. Селекцию клонов производили на агаризованной питательной среде, содержащей канамицин (50 мг/мл). Интеграцию вектора в геном дополнительно проверяли методом ПЦР с колоний с помощью олигонуклеотидов pMV306-For и pMV306-Rev.

Компетентные клетки, которые были получены на основе культур отобранных колоний трансформировали вторым вектором репортерной системы (pAMYC-F6 или pAMYC-F6-mut), содержащим два гена устойчивости: к тетрациклину и к хлорамфениколу. Селекцию клонов производили на агаризованной питательной среде, содержащей антибиотики тетрациклин (25 мкг/мкл) (Sigma-Aldrich, США) и хлорамфеникол (35 мкг/мкл) (Sigma-Aldrich, США). Присутствие вектора в отобранных колониях дополнительно проверяли методом ПЦР колоний с помощью олигонуклеотидов pAMYC-For и pAMYC-Rev.

2.12 Создание гиперэкспрессирующих нкРНК MTS1338 и контрольных штаммов *M. smegmatis* (msm_pMV261_1338, msm_pMV261_E) и *M. tuberculosis* (mtb_pMV261_1338, mtb_pMV261_E)

Для создания вектора для гиперэкспрессии малой РНК MTS1338 мы выбрали классический микобактериальный автономный шаттл-вектор pMV261 (Addgene, США). Последовательность промотора гена *rnrB* *M. smegmatis* амплифицировали методом ПЦР с помощью олигонуклеотидов *rnrB_200_xbaI_for* и *rnrB_200_hindIII_rev* лигировали в линейаризованный по рестрикционным сайтам XbaI и HindIII вектор pMV261. После этого амплифицировали ген малой РНК MTS1338 на матрице геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv с помощью олигонуклеотидов MTS1338_HindIII_for и MTS1338_HindIII_rev, а затем лигировали в полученный на предыдущем этапе линейаризованный вектор pMV261rnrB по рестрикционному сайту HindIII. В качестве контрольной плазмиды, без гена MTS1338, использовали вектор pMV261rnrB. Правильность фрагментов созданных конструкций подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера (Евроген, Россия). Схема создания указанных векторов приведена в приложении Д.

Полученными конструкциями (pMV261-MTS1338, pMV261rnrB) трансформировали подготовленные компетентные клетки *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* методом электропорации. Плазмида pMV261 содержит ген устойчивости к канамицину, поэтому селекцию клонов проводили на агаризованной питательной среде с добавлением канамицина (50 мкг/мл). Дополнительно присутствие плазмиды в отобранных клонах подтверждали методом ПЦР с колоний с помощью олигонуклеотидов pMV261_ins_F и pMV261_ins_R. Гиперэкспрессия MTS1338 в созданных штаммах msm_pMV261_1338 и mtb_pMV261_1338 была подтверждена методом количественной ПЦР с использованием олигонуклеотидов qPCR_MTS1338-f и qPCR_MTS1338-r.

2.13 Создание транскрибирующего нкРНК MTS1338 и контрольного штаммов *M. smegmatis*, экспрессирующих GFP (*msm_GFP_pMV261_1338*, *msm_GFP_pMV261_E*)

Генно-инженерная конструкция для одновременной транскрипции нкРНК MTS1338 и экспрессии GFP в *M. smegmatis* была создана на основе вышеописанного вектора pMV261. Для этого последовательность гена *eGFP* вместе с промотором *hsp60* и терминатором амплифицировали методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов pMV261_ins_F и pMV261_term, используя в качестве матрицы плазмиду pMV261-GFP. Полученный фрагмент лигировали в созданный ранее линейаризованный вектор pMV261rrnB-MTS1338 или pMV261rrnB (контрольная конструкция) по рестрикционному сайту DraI. Правильность фрагментов созданных конструкций подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера (Евроген, Россия). Схема создания указанных векторов приведена в приложении Е.

Полученными конструкциями (pMV261-MTS1338-GFP, pMV261rrnB-GFP) трансформировали компетентные клетки *M. smegmatis*, селекцию проводили на твердой агаризованной среде с добавлением канамицина (50 мкг/мл). Экспрессию GFP в клеточных культурах отобранных клонов подтверждали с помощью конфокальной микроскопии.

2.14 Стрессовые воздействия *in vitro*

M. smegmatis: Холодовой стресс. Для экспериментов с холодowym стрессом культуру *M. smegmatis* выращивали до средне-логарифмической фазы ($OP_{600} = 0,7$) в жидкой питательной среде при 37°C, а затем культивацию продолжали в орбитальном водяном шейкере Innova 3100 (New Brunswick Scientific, США) при 15°C со скоростью 200 об/мин, периодически измеряя оптическую плотность культуры. Пробы объемом 10 мл забирали перед холодowym стрессом и через 2 ч, 5 ч и 24 ч после начала воздействия низких температур. Полученные культуры использовали для экстракции тотальной РНК.

M. smegmatis: Окислительный и кислотный стрессы. Культуру *M. smegmatis* выращивали до ранней логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0,3$) в жидкой питательной среде Sauton с добавлением 0,05% Tween 80. Для симуляции окислительного и кислотного стрессов культуру инкубировали при 37°C в орбитальном шейкере (200 об/мин) с добавлением H₂O₂ (5 мкМ) (Merck, Германия) в течение 8 часов или HCl (5 мкМ) (Химмед, Россия) в течение 2 часов соответственно. Для контроля без стрессовых условий штаммы культивировали в такой же питательной среде в течение аналогичного времени.

M. tuberculosis: Окислительный, кислотный, нитрозативный стрессы. Для симуляции кислотного стресса культуру *M. tuberculosis* выращивали до средней логарифмической (ОП₆₀₀ = 1,0) или стационарной (ОП₆₀₀ = 2,0) фаз роста в зависимости от эксперимента, центрифугировали (4°C, 3000 g, 10 мин), промывали фосфатно-солевым буфером и разводили до ОП₆₀₀ = 0,2 (~10⁷ КОЕ/мл) в жидкой питательной среде Sauton, pH 5,5. Инкубацию продолжали на протяжении 48 часов.

Для симуляции нитрозативного или окислительного стрессов культуры бактерий той же оптической плотности (~10⁷ КОЕ/мл) инкубировали в среде Sauton (pH 7,0) в течение 48 часов с добавлением 0,5 мМ DETA NONOate (Sigma-Aldrich, США) или 10 мМ H₂O₂ соответственно.

Для контроля без стрессовых условий штаммы культивировали в среде Sauton в течение аналогичного времени.

2.15 Получение некультивируемых форм микобактерий

M. smegmatis. Культуры клеток *M. smegmatis*, выращенные в жидкой питательной среде инокулировали в 150 мл модифицированной среды без ионов калия [111] Hartman's-de Bont (содержит (на 1 литр): 11,8 г Na₂HPO₄·12H₂O, 1,7 г лимонной кислоты, 20 г (NH₄)₂SO₄, 30 мл глицерина и 10 мл раствора микроэлементов (содержат (на 1 литр): 1 г ЭДТА, 10 г MgCl₂·6H₂O, 0,1 г CaCl₂·2H₂O, 0,04 г CoCl₂·6H₂O, 0,1 г MnCl₂·2H₂O, 0,02 г Na₂MoO₄·2H₂O, 0,2 г ZnSO₄·7H₂O, 0,02 г CuSO₄·5H₂O, и 0,5 г FeSO₄·7H₂O)). После добавления и перемешивания всех компонентов, pH среды доводили до 7,0, и добавляли 0,05% Tween 80 и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Cohn-Analog, США). В случае плазмид-содержащих штаммов (ΔF6::F6, ΔF6::pMV306), в среду также добавляли селективный антибиотик канамицин (50 мг/мл). Культуры инкубировали при 37°C на орбитальном шейкере (200 об/мин).

M. tuberculosis. Культуру клеток *M. tuberculosis* штамма H37Rv, выращенную до средней стационарной фазы роста (ОП₆₀₀ = 4,0) инокулировали (5 × 10⁵ клеток/мл) в среду Sauton с дефицитом ионов калия (содержащую 8,9 г Na₂HPO₄ · 12 H₂O вместо 0,5 г KН₂PO₄) и выращивали при 37°C при постоянном покачивании (200 об/мин). После 14–15 дней культивирования добавляли 5 мкг/мл рифампицина (Sigma-Aldrich, США) для устранения культивируемых бактерий и получения популяции некультивируемых клеток, которые при высеве на агаризованную питательную среду не образуют колоний.

2.16 Реактивация некультивируемых форм микобактерий

M. smegmatis. Реактивацию и оценку наиболее вероятного числа (НВЧ) живых бактерий *M. smegmatis* проводили в 48-луночных планшетах (Corning Inc., США), которые содержали 450 мкл жидкой питательной среды Sauton и 10^5 - 10^6 клеток *Micrococcus luteus* в экспоненциальной фазе роста в соответствии с протоколом описанным ранее [111]. Бактерии *M. luteus* не препятствовали оценке роста *M. smegmatis*, т.к. они не делятся в питательной среде Sauton. Серийно (десятикратно) разведенные пробы культуры *M. smegmatis* в объеме 50 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C с покачиванием (100 об/мин) на протяжении 7 дней. Лунки с видимым ростом бактерий считали положительными, а НВЧ определяли с использованием стандартных таблиц [112].

M. tuberculosis. Некультивируемые клетки *M. tuberculosis* осаждали центрифугированием (4°C, 3000 g, 20 мин), промывали дважды стерильной питательной средой Sauton и разводили в 5 раз от исходного объема культуры «средой для реактивации», которая представляет собой стандартную среду Sauton, содержащую 0,6% глицерина, ростовую добавку альбумин-декстроза-каталаза (10%) и Tween 80 (0,05%) [113], после чего добавляли равный объем отобранного ранее супернатанта. Бактериальные культуры инкубировали с перемешиванием (150 об/мин) при 37°C и постоянном перемешивании и собирали в анализируемые временные точки для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) и включения радиоактивного урацила. В одном из вариантов эксперимента протокол реактивации проводили с добавлением 5 мкг/мл рифампицина.

2.17 Инфекция

M. tuberculosis in vivo, инфекция мышей. Мышей линий C57BL/6Y (B6) содержали в стандартных условиях в виварии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза в соответствии с рекомендациями Министерства здравоохранения Российской Федерации и под гарантией № А5502-11 Управления защиты лабораторных животных Национального института здравоохранения (НИИ). Для экспериментов использовали самок мышей возрастом 2,5–3 месяца. Все экспериментальные процедуры были одобрены комитетом биоэтики ЦНИИТ.

Перед подготовкой к заражению культуру микобактерий выращивали до средней логарифмической стадии роста ($OP_{600} = 0,8-1,0$) в жидкой питательной среде Дюбо (BD Bioscience, США) с добавлением 0,5% обезжиренного бычьего сывороточного альбумина

(Calbiochem-Behring Corp., США) при 37°C и постоянном помешивании (200 об/мин). Полученную культуру трижды центрифугировали (4°C, 3000 g, 20 мин) и промывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,2 мМ EDTA и 0,025% Tween 80. Культуры фильтровали через мембранные фильтры с порами диаметром 5 мкм (Millipore, США). Отфильтрованную культуру *M. tuberculosis* хранили при 4°C.

Для заражения мышей культуру микобактерий ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере. Заражение мышей осуществляли через дыхательные пути (~100 КОЕ на мышь) с помощью системы ингаляционной доставки аэрозоля (Glas-Col, США). Размер дозы подтверждали с помощью предварительных экспериментов, в ходе которых на агаризованную среду Дюбо высевали серийные двукратные разведения 2 мл гомогената из легких мышей обеих линий, полученные после двухчасовой инфекции; через 3 недели инкубации при 37°C производили подсчет КОЕ.

M. tuberculosis ex vivo, инфекция перитонеальных макрофагов. Для получения перитонеальных макрофагов, мышам линии В6 внутрибрюшинно вкалывали 3% раствор пептона (Sigma-Aldrich, США) в солевом буфере. Через 5 дней клетки перитонеального экссудата элюировали из брюшной полости с помощью фосфатно-солевого буфера, не содержащего ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , с добавлением 2% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 10 Ед/мл гепарина (Sigma-Aldrich, США). Затем клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США), которая содержала 5% фетальной бычьей сыворотки, 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich, США) и 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США). Содержание клеток с позитивной реакцией на неспецифическую эстеразу в перитонеальном экссудате превышало 85%. Экссудат высевали на 90 мм чашки Петри (Corning Inc., США) в концентрации 10^7 клеток на чашку в 10 мл питательной среды RPMI-1640, которая содержала 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамин для получения монослоя макрофагов. Клетки инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO_2 для адгезии, после чего добавляли микобактерии, ресуспендированные в 10 мл питательной среды RPMI-1640 с множественностью инфекции (МИ) 20, 15 и 5 для инкубации в течение 2, 4 и 24 часов соответственно. Культуры микобактерий без макрофагов использовали в качестве контроля.

Для экспериментов с активацией макрофагов, монослой обрабатывали мышиним IFN- γ (100 Ед/мл) (Sigma-Aldrich, США) за 14 часов до добавления микобактерий. Для блокировки iNOS добавляли L-NIL (Sigma-Aldrich, США) в финальной концентрации 100 мкМ за 1 час до обработки IFN- γ .

M. smegmatis ex vivo, инфекция макрофагов RAW 264.7. Клеточную линию RAW 264.7 (TIB-71™, ATCC®, США) культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10%

эмбриональной бычьей сыворотки при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 24 часов до достижения степени конфлюэнтности 70-80%.

Клеточную культуру *M. smegmatis*, выращенную до средней логарифмической фазы роста (ОП₆₀₀ = 0,8), промывали в фосфатно-солевом буфере, ресуспендировали в RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и добавляли к макрофагам с МИ 10:1. Чтобы использовать равное количество контрольных и транскрибирующих MTS1338 бактерий при инфицировании макрофагов, бактериальные клетки подсчитывали методом оценки числа колониобразующих единиц (КОЕ).

Клетки RAW264.7, выращенные в 24-луночных планшетах (Corning Inc., США) по 5×10^4 клеток в лунке, инфицировали штаммами *M. smegmatis*. Через 3 часа клетки промывали фосфатно-солевым буфером пять раз, чтобы убрать нефагоцитированные бактерии, и выращивали еще 21 час. После этого культуру промывали фосфатно-солевым буфером и лизировали в охлажденном растворе 0,01% SDS (Sigma-Aldrich, США). Аликвоты этой суспензии серийно (десятикратно) разводили в растворе деионизированной воды с добавлением 0,05% Tween-80, и по 5 мкл от каждого разбавления наносили на агаризованную твердую среду LB в трипликате; число колоний подсчитывали через 72 часа и выражали как КОЕ/мл.

2.18 Оценка выживаемости микобактерий

M. smegmatis. Бактериальную суспензию разводили серийно в десятикратном разбавлении в жидкой питательной среде, после чего 100 мкл каждого разведения вносили на агаризованную питательную среду. Затем инкубировали при 37°C в течение 3 дней и проводили оценку числа колониобразующих единиц (КОЕ).

M. tuberculosis. Для оценки КОЕ *M. tuberculosis* после инфекции лёгкие отдельных мышей гомогенизировали в 2 мл стерильного солевого раствора. Десятикратные серийные разведения высевали на чашки с агаризованной средой Дюбо. Оценка проводилась после инкубации при 37°C в течение 20-22 дней.

2.19 Измерение уровня включения радиоактивно меченного урацила

Оценку выживания *M. tuberculosis* в условиях действия стрессов *in vitro* проводили через 24 и 48 часов воздействия стресса путем измерения включения ³H-урациловой метки. Для этого

к 1 мл культуры добавляли 2 мкл 5,6- ^{3}H -урацила (2 мкКи) (Изотоп, Россия) и инкубировали при 37°C и постоянном покачивании (200 об/мин) 20 часов. После этого 200 мкл культуры добавляли к 3 мл 7% охлажденной трихлоруксусной кислоты (Химмед, Россия), инкубировали 15 минут при 0°C и фильтровали через микробиологический фильтр (Whatman, США). Осажденные клетки последовательно промывали 3 мл 7% трихлоруксусной кислоты и 3 мл 86% этанола, затем фильтры помещали в 10 мл сцинтилляционной смеси Ultima Gold (PerkinElmer, США). Скорость включения урацила (CPM) определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS analyser (Beckman Coulter, США).

2.20 Нозерн-блоттинг

Тотальную бактериальную РНК (2 мкг) разделяли в 10% денатурирующем полиакриламидном геле в трис-боратном буфере, переносили на нейлоновую мембрану Hybond[®]-N+ Membranes (Cytiva, Великобритания) капиллярным методом и запекали с помощью системы для сушки при 70°C в течение 2 часов. Затем мембрану инкубировали 12-18 часов при 42°C в гибридизационном буфере ULTRAhyb[™]-Oligo (Thermo Fisher Scientific, США) вместе с радиоактивно меченым на 5'-конце олигонуклеотидом (15 пмоль), комплементарным детектируемой РНК. Метку олигонуклеотида производили с использованием 10 мкКи $[\gamma^{32}\text{P}]$ -АТФ (Изотоп, Россия) и T4 полинуклеотидкиназы (Thermo Fisher Scientific, США). После гибридизации мембрану трижды промывали в хлоридно-содовом цитратном буфере (SSC) (0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат натрия, pH 7,0), содержащем 0,1% SDS; при этом, каждую следующую промывку совершали, используя более разведенный SSC буфер (2x SSC, 1x SSC, 0,5x SSC). Затем мембрану экспонировали перед рентгеновской плёнкой Retina (Carestream Health, США) для детекции радиоактивности.

2.21 Вестерн-блоттинг

Осажденную клеточную культуру лизировали с помощью 0,1 мм циркониевых шариков и гомогенизатора BeadBeater, полученный лизат инкубировали 5 мин при 95°C в SDS буфере (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 0,2% бромфеноловый синий, 20% глицерин, 200 мМ DTT). Концентрацию белков измеряли по методу Брэдфорда. Равные количества белков (5 мкг) разделяли в 12% полиакриламидном геле с добавлением 0,1% SDS с помощью системы Mini

Trans-Blot[®] Cel (Bio-Rad, США). После этого белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану Amersham[™] Hybond P[®] (Cytiva, Великобритания) с помощью камеры для электроблоттинга Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). После переноса мембрану блокировали 5% раствором обезжиренного сухого молока (Bio-Rad, США) и инкубировали с раствором первичных антител, специфичных к консервативному домену Rpf (реактив предоставлен Салиной Е.Г., ИНБИ РАН). Затем мембрану инкубировали с раствором вторичных антител (Cell Signaling Technology, США), конъюгированных с пероксидазой хрена и специфичных к первичным антителам. Детекцию сигнала осуществляли с помощью коммерческого набора Clarity Western ECL (Bio-Rad, США) в гельдокументирующей системе ChemiDoc Touch imager station (Bio-Rad, США).

2.22 Конфокальная микроскопия

Макрофаги линии RAW 264.7, культивированные в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, высаживали в среде без добавления антибиотика на покровные стекла 18 × 18 мм Menzel[™] (Thermo Fisher Scientific, США), помещенные в 6-луночные культуральные планшеты (Corning Inc., США). Через 24 часа клетки (5×10^4 клеток/стекло) инфицировали штаммом *msm_GFP_pMV261_1338* или *msm_GFP_pMV261_E* (контрольный штамм) с МИ 10:1, и инкубировали 3 часа. В экспериментах с использованием реактива LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, США) краситель добавляли за 1 час до завершения инфицирования в конечной концентрации 50 нМ. Через 3 часа среду удаляли, клетки промывали трижды фосфатно-солевым буфером, фиксировали в 1% параформальдегиде (Химмед, Россия) в течение 10 минут и снова трижды промывали фосфатно-солевым буфером. Для окрашивания компартментов, ассоциированных с гликопротеином лизосомальной мембраны LAMP-1, клетки инкубировали с первичными антителами к LAMP-1 (sc-20011, Santa Cruz Biotechnology, США), разведёнными в соотношении 1:80 в фосфатном буфере с содержанием 0,1% реактива Triton[™] X-100 (Sigma-Aldrich, США), на протяжении ночи при 4°C. Монослой клеток промывали три раза по 10 минут в том же буфере, инкубировали с Alexa Fluor 568-конъюгированными козьими антителами к мышинным IgG (H + L) (A-21422, Thermo Fisher Scientific, США) разведенными в соотношении 1:500 в течение 1 часа при комнатной температуре и промывали, трижды. Ядра клеток окрашивали при помощи раствора красителя 5 мкг/мл Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 5 минут. Детекцию микобактерий осуществляли по GFP-флуоресценции при длине волны 488 нм, в то время как фагосомы (окрашивание

LysoTracker Red DND-99 и LAMP-1) визуализировали при длине волны 543 нм, а ядра клеток при длине волны 405 нм с использованием конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония). Пропорцию фагосом с GFP-меткой, колокализирующихся с LAMP-1 и LysoTracker Red DND-99, рассчитывали путем анализа 50 фагосом в 4 случайных полях для каждого образца. Всего было проведено три независимых биологических эксперимента.

2.23 Количественная оценка флуоресценции GFP

Культуры штаммов *M. smegmatis*, трансформированные генно-инженерными конструкциями для экспрессии GFP, растили до средней логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0,8$), центрифугировали (4°C, 4000 об/мин, 10 мин), дважды промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 0,1 мм циркониевые шарики и лизировали при помощи гомогенизатора BeadBeater. Лизаты центрифугировали (4°C, 4000 об/мин, 5 мин) и 200 мкл супернатанта переносили в 96-луночный планшет (Corning Inc., США). Флуоресценцию GFP измеряли при помощи флуориметрического анализатора Tecan™ GENios® Microplate (Tecan, Швейцария) с длинами волны возбуждения и эмиссии 488 и 510 нм соответственно. Статистические метрики определяли по трем биологическим репликам.

2.24 Измерение концентрации белков по методу Бредфорда

Образцы белка и стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина с различной концентрацией от 0,125 до 1 мг/мл разводили в фосфатно-солевом буфере до финального объема 1 мл. Затем к каждому образцу и стандартному раствору добавляли 5 мл реагента Бредфорда (Bio-Rad, США). После инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут, 1 мл раствора переносили в стерильные кюветы и проводили фотометрическое измерение поглощения при длине волны 595 нм с использованием спектрофотометра UNICO 2100 (UNICO, США).

Калибровочный график строили на основе данных измерений стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина. Концентрацию белка в образцах определяли путем сравнения их поглощения со стандартным графиком. Все измерения проводили в трехкратных повторениях.

2.25 Определение уровня цитокинов

Макрофаги линии RAW264.7 культивировали в 6-луночных планшетах (Corning Inc., США) до плотности 7×10^5 клеток в лунке в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, инфицировали штаммами *M. smegmatis* с МИ 10:1 в течение 3 часов, затем промывали пять раз фосфатно-солевым буфером и культивировали в течение 4 и 24 часов. После этого к культурам добавляли 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) и проводили экстракцию РНК по фенол-хлороформному методу, описанному в разделе 2,3. Синтез кДНК и количественную ОТ-ПЦР выполняли в соответствии с протоколом, описанным в разделе 2,7.

2.26 Пробоподготовка библиотек для массового параллельного секвенирования и секвенирование

На первом этапе проводили деплецию рРНК. В эксперименте с изучением влияния холодового стресса на транскриптом *M. smegmatis* этот шаг выполняли при помощи коммерческого набора NEBNext[®] rRNA Depletion Kit (Bacteria) (NEB, США). Для эксперимента по исследованию транскриптома мутантного штамма *M. smegmatis* по гену нкРНК F6 использовали коммерческий набор Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina, США). В эксперименте по изучению влияния стрессоров на транскриптом двух штаммов *M. tuberculosis* (штаммы mtb_pMV261_1338, mtb_pMV261_E) деплецию проводили по протоколу, описанному в статье Huang и соавторов [114], с использованием РНКазы H. Для этого методом ПЦР с использованием пар олигонуклеотидов (16S_F/16S_R и 23S_F/23S_R), один из каждой пары которых был фосфорилирован, амплифицировали гены 16S и 23S РНК *M. tuberculosis* H37Rv. Амплифицированные фрагменты инкубировали с экзонуклеазой фага лямбда (NEB, США) для гидролиза одной из цепей ДНК. Полученные ампликоны смешивали с пробами РНК в количественном соотношении 10:1 (Ампликоны:РНК) и производили гибридизацию путем нагрева до 95°C с последующим охлаждением до 45°C в течение 10 минут. После этого к пробам добавляли РНКазу H (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в соответствии с протоколом. Полученные пробы повторно обрабатывали ДНКазой TurboDNase для удаления ДНК.

Деплетированные РНК-пробы использовали для создания библиотек при помощи набора Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя. В случае секвенирования короткой фракции РНК, шаг фрагментирования РНК пропускали.

Секвенирование проводили в трипликатах на платформе Illumina HiSeq2500 или Illumina NovaSeq 6000 (Евроген, Россия) в форме двухконцевых прочтений длиной 100 и 150 нуклеотидов соответственно.

2.27 Анализ данных массового параллельного секвенирования

На первом этапе проводили проверку качества полученных прочтений при помощи программы FastQC (Babraham Institute, Великобритания). После этого, при помощи программы Bowtie2 [115] прочтения картировали на референсный геном изучаемого организма: в случае *M. smegmatis* был использован геном NC_008596,1, а в случае *M. tuberculosis* - AL123456,3; последовательности генома были получены с веб-сайта базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Картирование проводили с использованием настроек «--local» и «--dovetail», которые позволяют выполнять локальное выравнивание и допускают «перекрывание» прочтений одной пары на референсном геноме. Подсчет картированных прочтений в рамках границ генов осуществляли с использованием программы featureCounts из пакета программ Subread [116], учитывая только однозначно картированные нехимерные фрагменты. Геномные аннотации для *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* были получены с веб-сайта базы данных Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>) [117].

Анализ дифференциальной экспрессии проводили при помощи пакетов программ DESeq2 [118] и edgeR [119]. Критерии для определения дифференциальной экспрессии генов подбирались индивидуально для каждого анализа. При этом скорректированный уровень р-значимости всегда составлял менее 0,1, а изменение экспрессии (FC, fold change) достигало как минимум двукратного значения.

Анализ обогащения генов по функциональным категориям выполняли с помощью онлайн-платформы DAVID [120].

Кластеризацию паттернов экспрессии генов во времени для анализа транскриптома *M. smegmatis* в условиях холодного стресса проводили при помощи пакета программ TCseq [121]. В данном виде анализа были использованы только те гены, которые были идентифицированы как дифференциально экспрессируемые хотя бы в одном из 5 проведенных сравнений.

2.28 Депонирование данных массового параллельного секвенирования

Все данные, полученные в результате массового параллельного секвенирования были загружены в репозиторий данных секвенирования Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) под идентификационными номерами GSE232901 (анализ транскриптома *M. smegmatis* в условиях холодового шока), GSE149173 (анализ транскриптома штамма *M. smegmatis*, мутантного по гену нкРНК F6) и GSE218354 (влияние нкРНК MTS1338 на транскриптом *M. tuberculosis* при действии различных стрессоров).

2.29 Аннотация некодирующих РНК *M. smegmatis*

Идентификацию генов предполагаемых нкРНК на основе данных, полученных в результате секвенирования фракции коротких РНК, проводили при помощи программы Rockhopper [122] со стандартными настройками. После детекции генов нкРНК для пробы каждой исследуемой временной точки (H0, H2, H5 и H24), результаты объединили в общую аннотацию, а гены-дубликаты удалили. Наименование аннотированных нкРНК производили в соответствии с шаблоном и рекомендациями, предложенными для микобактерий в статье Lamichhane и соавторов [123]. Для оценки и сравнения экспрессии генов нкРНК между пробами, данные, полученные для всего транскриптома, были повторно проанализированы по описанному выше алгоритму с использованием новой аннотации генов нкРНК.

2.30 Пробоподготовка и исследование протеома

Культуры *M. smegmatis* выращивали в жидкой питательной среде до стационарной фазы роста ($ОП_{600} = 2,0$), после чего центрифугировали (4°C , 3000 g, 10 мин) и ресуспендировали в лизирующем буфере (100 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 4% SDS, 10 мМ DTT, коктейль протеазных ингибиторов (Sigma-Aldrich, США)). Затем добавляли 0,1 мм циркониевые шарики и лизировали с помощью гомогенизатора Bead Beater. Полученный лизат центрифугировали (10 мин, 12000 об/мин, 4°C), фильтровали через фильтр с диаметром пор 20 мкм (Millipore, США) и инкубировали при 85°C в течение 10 мин. Концентрацию белка оценивали с помощью коммерческого набора microBCA™ (Thermo Fisher Scientific, США). Аликвоты, содержащие 50

мг белка, разводили до 1 мг/мл лизирующим буфером, и добавляли Трис (2-карбоксиитил) фосфин гидрохлорид (ТСЕР-НСl) и хлорацетамид (САА) в конечных концентрациях 10 и 20 мМ для восстановления и алкилирования цистеина соответственно, с последующей инкубацией при 80°C в течение 10 мин. Затем белки осаждали пятью объемами ацетона при -20°C в течение 16 часов; осадок дважды промывали ацетоном, ресуспендировали в 50 мл раствора 100 мМ Tris рН 8,5, 1% SDS с помощью соникации и обрабатывали трипсином (Promega, США), добавленным в соотношении 1/100 (трипсин к белку) в течение 2 часов при 37°C. После этого добавляли вторую порцию трипсина в том же соотношении и инкубировали образец в течение ночи при 37°C. Протеолиз останавливали 1% раствором трифторуксусной кислоты, а осажденный SDS удаляли после центрифугирования.

Пробоподготовку секретированных белков, выделяли из супернатантов жидких культур, проводили по аналогичному протоколу. Супернатанты дважды фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, США), а затем белки осаждали 10% растворе трифторуксусной кислоты в ацетоне в присутствии 0,015% SDS.

Масс-спектрометрический анализ и обработка результатов были выполнены в совместно с Зиганшиным Р.Х. (ИБХ РАН) на системе HPLC Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, США), подключенной к масс-спектрометру Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Данные масс-спектрометрического протеомного анализа были размещены в консорциуме ProteomeXchange через партнерский репозиторий PRIDE [124] под идентификационным номером PXD019813.

2.31 Предсказание мишеней бактериальных нкРНК

Для предсказания потенциальных мишеней бактериальных нкРНК использовали программы CopraRNA [125] и TargetRNA3 [126]. Последовательности интересующих нкРНК были получены из экспериментальных исследований и приведены в соответствие с требованиями указанных программ. При работе с программой CopraRNA последовательности загружали на официальный веб-сайт (<https://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp>) и проводили анализ, используя стандартные настройки.

Аналогично, для анализа в TargetRNA3 последовательности загружали на соответствующий веб-сайт (<https://cs.wellesley.edu/~btjaden/TargetRNA3/>), также с применением стандартных параметров.

2.32 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft office Microsoft Excel Office 365 и GraphPad Prism 8,0 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как среднее (mean) \pm стандартное отклонение (SD). Для сравнения данных, распределение которых соответствует нормальному, применяли t-тест Стьюдента. Для данных, распределение которых не соответствует нормальному, использовали тест Манна-Уитни. Разницу считали статистически значимой при значении $p \leq 0,05$. Для каждого эксперимента проводили по крайней мере 3 независимых репликата.

2.33 Визуализация

Визуализацию картирования РНК-секвенирования проводили с помощью геномного браузера IGV [127]; подсчет глубины покрытия осуществляли с помощью пакета программ deepTools2 [128]. Диаграммы Volcano для дифференциально экспрессирующихся генов были построены с помощью пакета программ EnhancedVolcano [129].

Вторичные структуры РНК были смоделированы с помощью онлайн-сервиса RNAfold [130] и визуализированы с помощью приложения VARNA [131].

Визуализацию всех нуклеотидных последовательностей ДНК выполняли с использованием геномного браузера SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/>).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Полнотранскриптомное исследование *M. smegmatis* в условиях холодового стресса

Холодовой стресс, определяемый как значительное падение температуры окружающей среды по сравнению с оптимальной температурой роста бактерий, представляет собой первостепенный вызов естественной среды для выживания бактерий. Как для непатогенных, так и патогенных микобактерий холодовой стресс представляет собой важную переменную окружающей среды. Он способен значительно замедлить их метаболическую активность, нормальное функционирование белков и всех клеточных процессов и даже привести к гибели клеток. Также, понижение температуры может вызывать существенные изменения текучести и функции бактериальных мембран, нарушать синтез белка и замедлять ферментативные реакции, необходимые для выживания клеток.

Однако наше понимание адаптации микобактерий к холодовому стрессу, особенно на уровне транскриптома, остается фрагментарным. Учитывая роль транскриптомных изменений в управлении бактериальным ответом на различные стрессы, исследование транскриптома микобактерий при холодовом стрессе может дать ключевое представление об их стратегии выживания в этих условиях. Необходимо также отметить, что, несмотря на внушительный объем информации об участии нкРНК в регуляции ответа бактерии на различные стрессы, практически ничего не известно о роли этих молекул в адаптации к низким температурам.

Эксперименты в этой главе направлены на изучение некодирующего транскриптома модельного организма *M. smegmatis* в ответе на холодовой стресс.

3.1.1 Акклимационная фаза *M. smegmatis* длится до 24 часов

Для поиска наиболее оптимальных временных точек исследования транскриптомной адаптации *M. smegmatis* к низким температурам, нами была проанализирована кривая роста *M. smegmatis* в жидкой питательной среде при 15 °C (Рисунок 12). Низкие температуры негативно влияют на клеточную пролиферацию, что приводит к стагнации роста клеточной культуры в первые несколько часов воздействия стресса. Первый статистически значимый прирост оптической плотности наблюдается через 24 часа после начала воздействия холодового стресса,

что коррелирует с описанными ранее данными [132]. После 24 часов воздействия низких температур было отмечено планомерное увеличение оптической плотности, что маркирует завершение адаптации *M. smegmatis* к новым условиям.

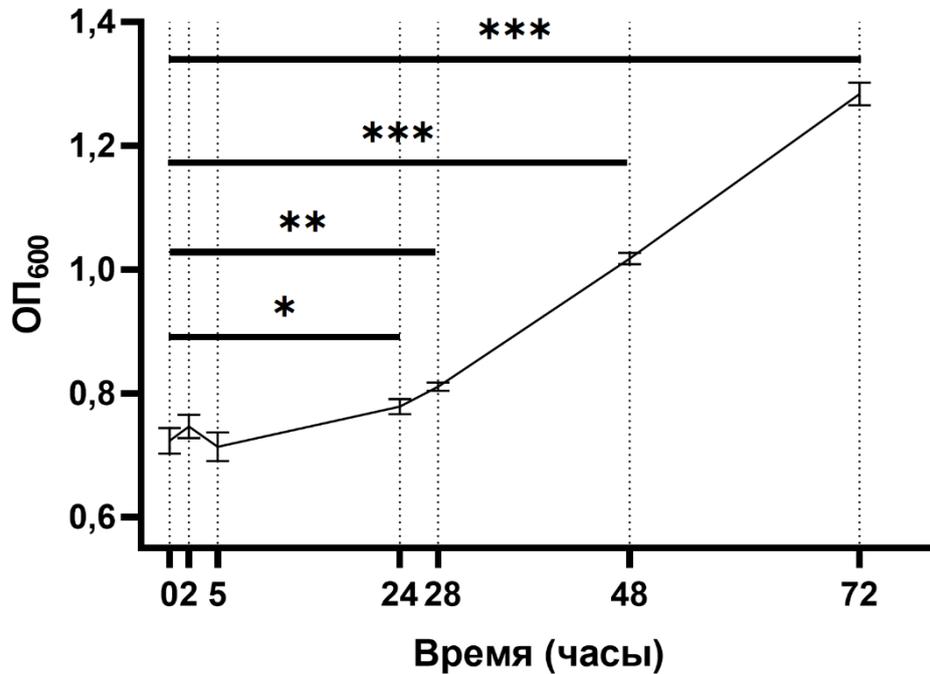


Рисунок 12 – Кривая роста *M. smegmatis* в условиях низких температур (15 °С); звездочками обозначено статистически значимое (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) приращение оптической плотности клеточной культуры относительно начальной точки (0 часов)

На основе этих данных для профилирования транскриптома были выбраны 4 временных точки: 0 часов (Н0, начальные условия до воздействия стресса), 2 часа и 5 часов (Н2 и Н5, акклимационная фаза, соответствующая начальному периоду адаптации) и 24 часа (Н24, фаза адаптированного состояния или постадаптационная стадия, в которой все долгосрочные адаптации уже произошли и клеточный рост возобновлен).

3.1.2 Транскриптомный адаптация *M. smegmatis* к условиям низких температур протекает в две стадии

Для того, чтобы раскрыть сущность происходящих адаптаций, нами было проведено полнотранскриптомное профилирование культур *M. smegmatis*, собранных в выбранных

временных точках. Анализ главных компонент полученных данных (Рисунок 13) демонстрирует наличие трех ярко выраженных кластеров, соответствующих адапционным стадиям: начальные условия (до воздействия стресса, H0), акклимационная фаза (временные точки H2 и H5) и фаза адаптированного состояния (временная точка H24).

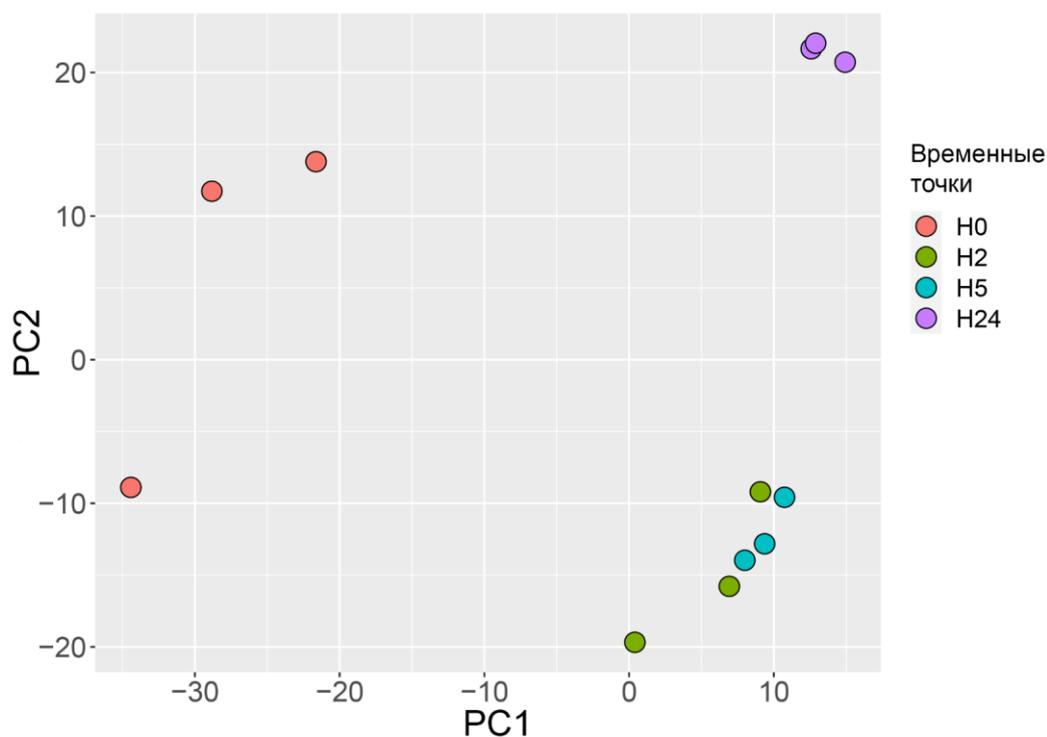


Рисунок 13 – Диаграмма двух главных компонент данных РНК-секвенирования проб *M. smegmatis*, инкубированных в условиях низких температур различное время

Мы провели анализ дифференциально экспрессированных генов в 3 возможных сравнениях относительно первоначальных условий (H2, H5 и H24 против H0), а также в динамике (H2 против H0, H5 против H2, H24 против H5). Было выявлено, что наиболее масштабные транскриптомные изменения происходят в ранние часы воздействия холодного стресса: за первые два часа инкубации при низких температурах изменилась экспрессия более чем в 2 раза почти полутора тысяч белок-кодирующих генов, что составляет примерно четверть от всех генов *M. smegmatis*. Диаграммы Volcano, демонстрирующие масштаб транскриптомных изменений в изученных сравнениях, приведены на Рисунке 14. Полные списки статистически достоверно дифференцированных генов для каждого сравнения размещены в онлайн-репозитории (<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241612706/s1>). Результаты анализа дифференциальной экспрессии, полученные на основе данных транскриптомного профилирования были

подтверждены с помощью метода количественной ПЦР нескольких случайно выбранных генов в независимом эксперименте (Приложение Ж).

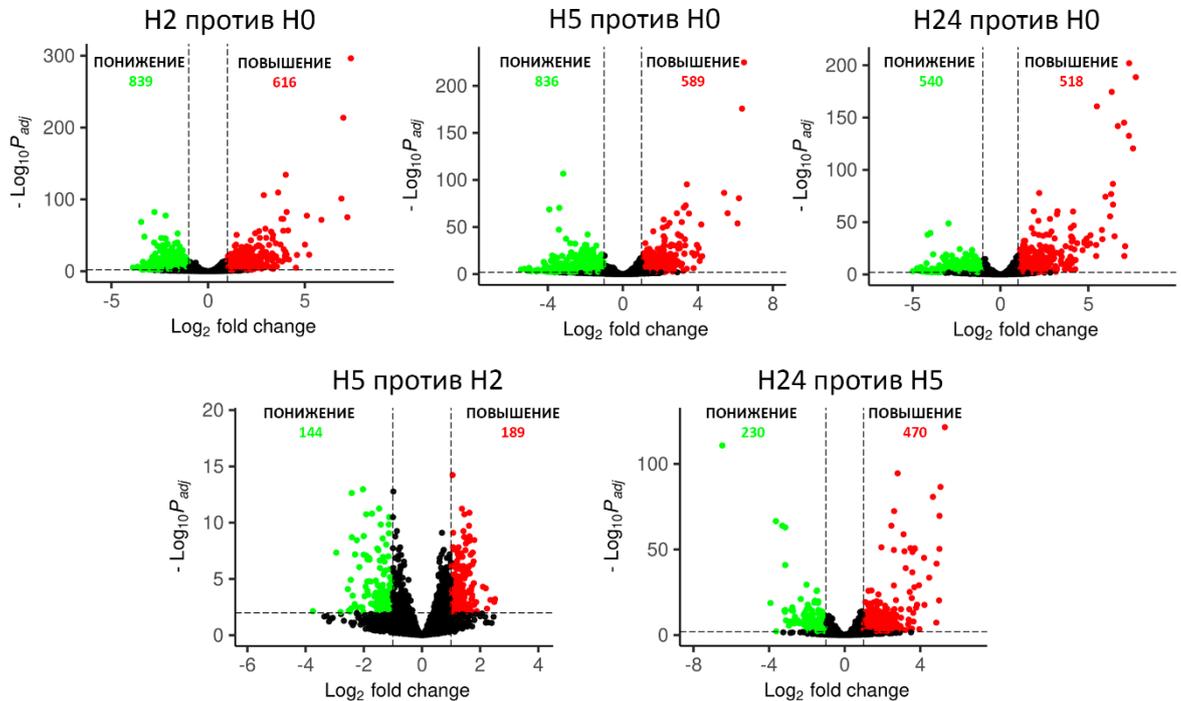


Рисунок 14 – Диаграммы Volcano, отображающие дифференциальную экспрессию генов в каждом из проведенных сравнений ($|\text{Log}_2\text{FC}| > 1,0$, $P_{\text{adj}} \leq 0,01$); гены, статистически достоверно повышающие свою экспрессию, отмечены красным цветом; понижающие - зеленым

На основе полученных данных был также проведен кластерный анализ данных секвенирования во времени с помощью пакета TCseq. Данный вид анализа позволяет выявлять основные паттерны экспрессии генов во времени, что помогает предположить их функциональную роль. Результаты кластеризации, полученные в результате этого анализа, размещены в онлайн-репозитории (<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241612706/s1>). Всего было выделено 6 паттернов экспрессии генов (Рисунок 15), форма каждого из которых отражает активность конкретного кластера генов в адаптации к низким температурам в определенный момент времени.

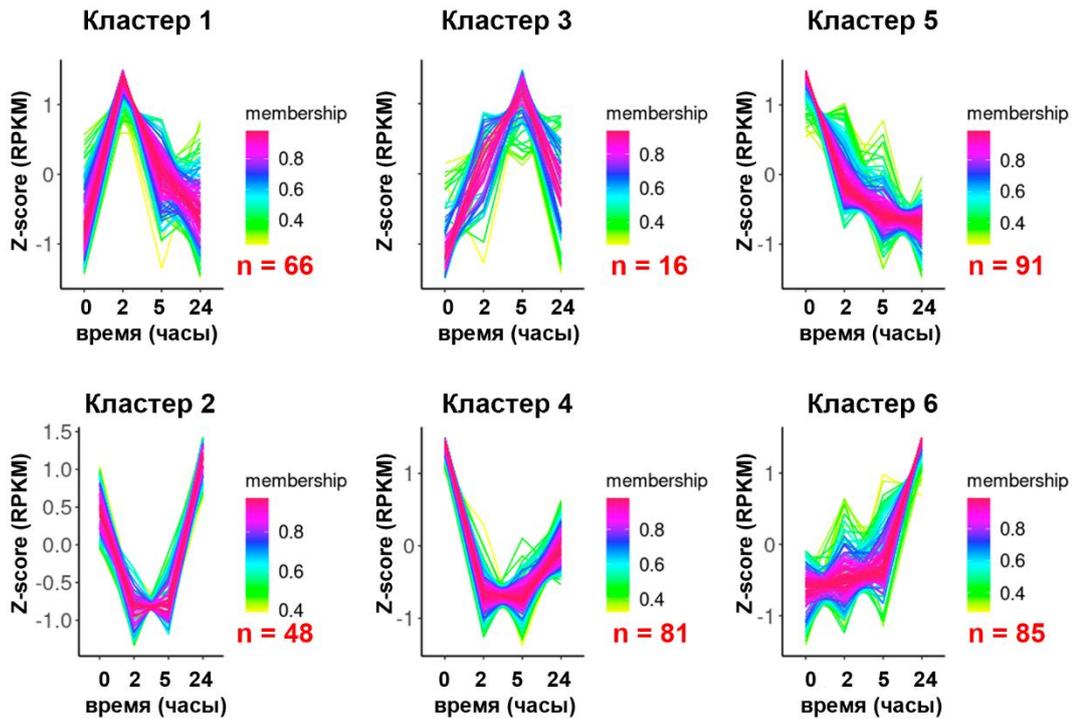


Рисунок 15 – Основные паттерны экспрессии генов во времени, полученные на основе кластерного анализа данных секвенирования; на оси ординат отображены нормализованные значения экспрессии в виде RPKM (Reads Per Kilobase Million); цвет обозначает степень, с которой каждый ген принадлежит кластеру (membership); значения n в правом нижнем углу обозначают количество генов в кластере

Экспрессия генов, принадлежащих к кластерам 1 и 3 резко возрастает в первые часы действия низких температур (2 и 5 часов) и снижается к 24 часам, что указывает на их участие в острой фазе ответа *M. smegmatis* на холодовой стресс. Им зеркальны кластеры 2 и 4, для которых характерно резкое падение экспрессии на коротких сроках, но возобновление к 24 часам. Наконец, кластер 5 охватывает гены, чья экспрессия только снижается со временем в условиях низких температур, и кластер 6, включающий гены, экспрессия которых начинает повышаться после начала действия стресса и максимальна к 24 часам: оба эти кластера охватывают долгосрочные изменения.

Таким образом, форма выявленных паттернов, подтверждает данные анализа главных компонент, показывая, что транскриптомная адаптация к холодовому стрессу протекает в 2 стадии. Начальная стадия включает в себя быстрые процессы, имеющие решающее значение для поддержания и выживания клеток во время непосредственного воздействия низких температур. Последующая стадия включает в себя долгосрочные адаптивные процессы, которые в конечном

итоге позволяют клетке повторно инициировать цикл деления и возобновить рост даже в условиях продолжающегося холодового стресса. Вместе эти две стадии представляют собой всеобъемлющую стратегию бактерии, направленную на выживание и развитие при низких температурах.

3.1.3 Адаптация *M. smegmatis* к низким температурам приводит к глобальным транскриптомным изменениям

Многие адаптационные процессы к холодовому стрессу уже были достаточно подробно описаны для таких бактерий, как например *E. coli* и *B. subtilis*, однако касательно микобактерий информация по этому вопросу остаётся крайне ограниченной. В результате анализа транскриптомных изменений, происходящий в *M. smegmatis* при воздействии низких температур, нами были выявлены основные функциональные блоки, отвечающие за адаптацию. При этом были обнаружены как сходства с ранее описанными процессами (синтез осмопротектантов, изменение состава клеточной мембраны), так и любопытные отличия (небольшие изменения в экспрессии основного холодового белка А - CspA, репрессия генов рибосомных белков). Ниже представлены основные функциональные изменения происходящие с *M. smegmatis* при адаптации к холодовому стрессу и выделено несколько белков-представителей для каждой категории:

- **РНК-шапероны.** Считаются одними из самых важных участников ответа на холодовой стресс и преимущественно участвуют в стабилизации РНК структур, препятствуя формированию вторичных структур. Белки, содержащие домен холодового шока (Cold shock proteins, CSP), традиционно представляют наиболее охарактеризованное семейство белков, участвующих в адаптации к низким температурам. Из двух аннотированных CSP белков *M. smegmatis* один не экспрессируется в условиях холодового стресса вообще (CspB), а другой (CspA) демонстрирует лишь незначительное (в 2 раза) увеличение экспрессии (тогда как у *E. coli* его экспрессия возрастает более чем в 25 раз). Среди генов РНК-шаперонов, белковые продукты которых потенциально могут принимать участие в адаптации *M. smegmatis* к низким температурам, можно выделить *MSMEG_1930* и *MSMEG_1540*.
- **Осмопротекторы.** Стабилизируют клеточные мембраны и белковые комплексы, предотвращая их деформацию и кристаллизацию при низких температурах. Мы показали, что главным осмопротектором *M. smegmatis* является эктоин, все гены синтеза которого

повышают экспрессию (*MSMEG_3898-MSMEG_3901*). Также выявлено повышение экспрессии генов, участвующих в метаболизме холина (*MSMEG_5967, MSMEG_5305, MSMEG_5944*).

- Модуляция состава клеточной стенки и мембраны. Низкие температуры существенно влияют на структурную и функциональную целостность клеточной стенки и мембран бактериальной клетки, что в итоге приводит к снижению текучести мембраны, изменению проницаемости и нарушению функций мембран-ассоциированных белков. Нами отмечено повышение ряда генов (*MSMEG_1350, MSMEG_0902, MSMEG_1205, MSMEG_3538, MSMEG_1351*) продукты которых участвуют в модификации миколовых кислот, что, предположительно, модулирует текучесть мембраны. Также, в первые часы ответа на холодовой стресс, повышается экспрессия ряда десатураз (*MSMEG_1743, MSMEG_5773, MSMEG_5248*), которые тоже принимают участие в снижении ригидности мембраны.
- Транскрипционные регуляторы и сигма-факторы. В процессе адаптации выявлено повышение экспрессии более 50 транскрипционных факторов, что отражает интенсивность происходящих с клеткой изменений. Среди них можно отметить транскрипционные факторы, участвующие в изменении липидного метаболизма (*MSMEG_0120, MSMEG_2794*), адаптации *M. smegmatis* к стационарному состоянию и голоданию (*MSMEG_1747*) и опосредующие глобальные реакции на стресс (*MSMEG_2694, MSMEG_6077*).
- Конформационные изменения ДНК и репарация. Обнаружено повышение экспрессии генов топоизомеразы первого типа (*MSMEG_1784*) и гена гистон-подобного белка *hup* (*MSMEG_2389*) в первые часы воздействия. Также было выявлено повышение экспрессии ряда генов, участвующих в репарации ДНК (*MSMEG_2943-MSMEG_2945, MSMEG_6083*).
- Транспортеры. Мы наблюдаем изменение экспрессии более 300 транспортеров *M. smegmatis* в условиях низких температур, что также указывает на глобальную перестройку метаболизма бактерии. Их можно поделить на 4 категории: транспортеры питательных веществ (преобладают, в основном, снижение экспрессии), транспортеры осмопротекторов бетаина и эктоина (повышение экспрессии), транспортеры липидов (различные паттерны экспрессии, отражающие изменение состава мембраны) и эффлюксные насосы (в основном, снижение экспрессии).
- Трансляция. Среди ранее описанных генов, связанных с трансляцией, экспрессия которых изменяется в условиях низких температур, в нашем транскриптоме было отмечено повышение только одного из их гомологов - *MSMEG_1878* (микобактериальный белок Y), функция которого заключается в гибернации 70S рибосомы. Однако было обнаружено, что

под действием стресса снижается экспрессия более 25 генов рибосомных белков, что до сих пор не отмечалось.

Указанные адаптации дают общее представление о динамике происходящих процессов и указывают пути, которые могут находиться под контролем экспрессирующихся в этом состоянии нкРНК.

3.1.4. Аннотация некодирующего транскрипта *M. smegmatis*

Для того, чтобы аннотировать границы генов потенциальных нкРНК, мы провели секвенирование фракции коротких РНК (до 300 нуклеотидов), выделенных из проб тотальной РНК каждой временной точки при помощи метода гель-электрофореза. Детекция границ генов нкРНК проводили с помощью программы Rockhopper [122], названия идентифицированных генов нкРНК были присвоены в соответствии с номенклатурой, предложенной Lamichhane и соавторами [123], согласно которой в наименовании локуса нкРНК указан ближайший белок-кодирующий ген.

Всего было обнаружено 43 цис-кодируемых и 13 транс-кодируемых нкРНК (приложение И); из них 5 нкРНК уже было описано в предыдущих работах. В работе Li и соавторов [95] нкРНК *M. smegmatis* определяли методом иммунопреципитации с гетерологично экспрессированным в *M. smegmatis* белком Hfq *E.coli*; было описано 4 транскрипта (IGR-2, IGR-3, IGR-5, и AS-5), границы которых перекрываются с обнаруженными в нашем исследовании (ncMSMEG10373B, ncMSMEG11192, ncMSMEG15794c и ncMSMEG1286 соответственно). Также в нашей работе была обнаружена Ms1 (ncMSMEG16173) - одна из наиболее изученных микобактериальных малых РНК, впервые описанная в работе Ránek и соавторов [133].

3.1.5 Цис-кодируемые нкРНК

Классический механизм действия цис-кодируемых нкРНК предполагает, что они кодируются на противоположной цепи от гена их мРНК-мишени. После образования межмолекулярного РНК-РНК дуплекса между цис-кодируемой нкРНК и её мРНК мишенью следует расщепление этого дуплекса РНК-нуклеазами, поэтому логично предположить, что увеличение экспрессии нкРНК будет приводить к снижению количества транскриптов мРНК-

мишени. В итоге такая зависимость может быть выражена в виде негативной корреляции между количествами транскриптов нкРНК и соответствующей мРНК мишени [134].

Чтобы проверить наличие подобной негативной корреляции в наших данных, мы провели корреляционный анализ между двумя наборами данных: первый представлял суммы прочтений (для каждой из временных точек), картированные в рамках границ идентифицированных цис-кодируемых нкРНК, а второй — суммы прочтений, картированные в рамках границ белок-кодирующего гена на противоположной цепи ДНК (для соответствующей временной точки). Корреляционные коэффициенты, полученные в результате анализа, представлены в виде графика на Рисунке 16.

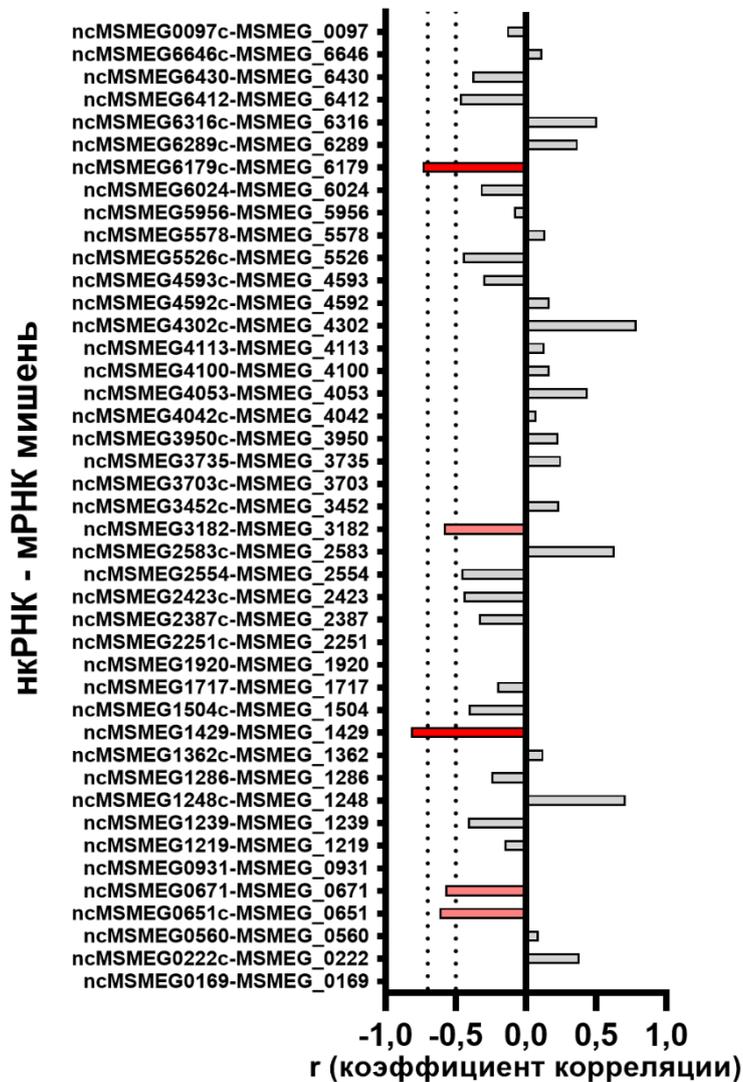


Рисунок 16 – Диаграмма корреляционных коэффициентов r между экспрессией идентифицированных нкРНК и их предполагаемых мРНК-мишеней; красным цветом выделены пары с негативным коэффициентом корреляции r меньше $-0,5$, интенсивность цвета отражает

силу коэффициента; вертикальными линиями обозначены пороги коэффициента корреляции $r = -0,5$ и $r = -0,7$

В результате анализа было определено, что сильными отрицательными коэффициентами корреляции ($-0,9 < r < -0,7$) обладают 2 пары нкРНК-мРНК: ncMSMEG1429-MSMEG_1429 и ncMSMEG6179c-MSMEG_6179, и средней силы ($-0,7 < r < -0,5$) - еще 3 пары (ncMSMEG0651c-MSMEG_0651, ncMSMEG3182-MSMEG_3182, ncMSMEG0671-MSMEG_0671). Примеры профилей экспрессии пар нкРНК-мРНК ncMSMEG1429-MSMEG_1429 и ncMSMEG0651c-MSMEG_0651 приведены на Рисунке 17.

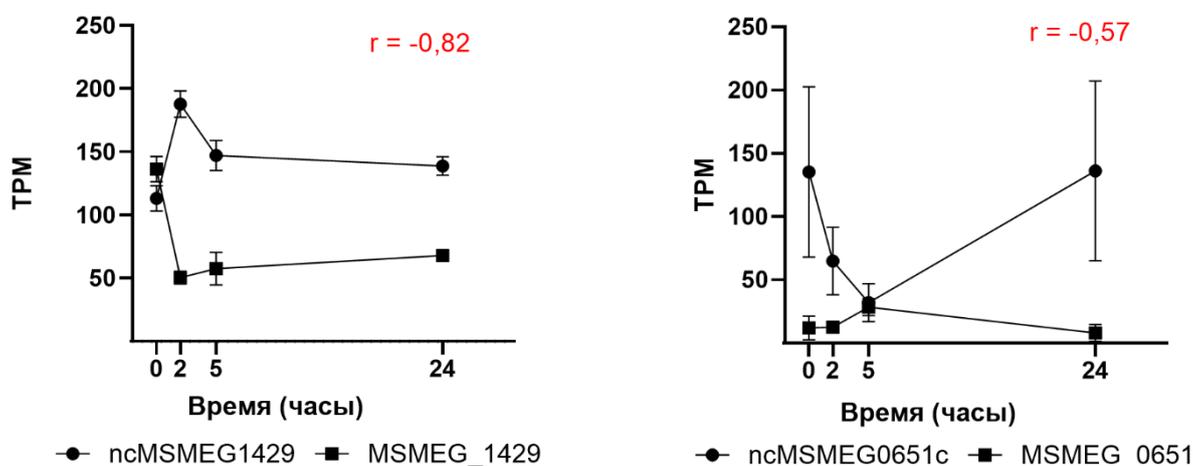


Рисунок 17 – Изменение транскрипции во времени цис-кодируемых нкРНК ncMSMEG1429 и ncMSMEG0651 и их предполагаемых мРНК мишеней MSMEG_1429 и MSMEG_0651 соответственно; транскрипция отображена в нормализованных значениях TPM (Transcripts per million); в правом верхнем углу указан коэффициент корреляции (r)

Ген MSMEG_6179 кодирует главную ацетил-коА синтетазу *M. smegmatis*, выполняющую реакции конверсии ацетата в Ацетил-КоА, одного из важнейших соединений цикл трикарбоновых кислот [135].

Продуктом MSMEG_1429 является цитохром P450terp, одна из форм микобактериальных цитохромов P450. Хотя точная функция этого белка на данный момент остается неясной, известно, что цитохромы P450 представляют собой разнообразную группу белков, участвующих в окислении многих соединений, в том числе и липидов [136].

Функции генов *MSMEG_0651* и *MSMEG_0671* на данный момент не установлены, известно, что они находятся под контролем альтернативного сигма фактора SigF, роль которого ассоциирована с адаптацией к широкому диапазону неблагоприятных условий [137]. Интересно, что в условиях холодового стресса нами была отмечена репрессия более 50 генов, входящих в *sigF* регулон, что свидетельствует о том, что они не вовлечены в адаптацию *M. smegmatis* к низким температурам. Репрессия *MSMEG_0651* и *MSMEG_0671* с помощью соответствующих антисмысловых нкРНК может являться дополнительным уровнем регуляции экспрессии этих генов.

Негативная регуляция перечисленных генов в процессе адаптации к холодовому стрессу может быть связана со стратегией сохранения энергии для выживания в неблагоприятных условиях. Мы предполагаем, что мРНК данных генов с наибольшей вероятностью являются мишенями соответствующих идентифицированных нкРНК.

Также необходимо отметить, что существуют варианты механизмов взаимодействия цис-кодируемой нкРНК с мРНК-мишенью, которые не приводят к снижению количества мРНК транскрипта, и поэтому отсутствие корреляции не является аргументом против их функционального взаимодействия. В частности, цис-кодируемые нкРНК могут модифицировать структуру мРНК или же влиять на эффективность её трансляции, не затрагивая уровень её экспрессии.

3.1.6 Транс-кодируемые нкРНК

Определение и проверка мишеней транс-кодируемых РНК является более сложной задачей, чем цис-кодируемых. Одним из наиболее перспективных и широко применяемых методов поиска мишеней для транс-кодируемых РНК служит использование специализированных предсказательных программ. Эти программы анализируют не только нуклеотидные последовательности, но и потенциальные вторичные структуры РНК, что позволяет идентифицировать возможные области взаимодействия между РНК. Такой комплексный анализ обеспечивает более высокую точность предсказания и учитывает уникальные особенности молекулярной структуры РНК. Однако стоит отметить, что, несмотря на эффективность предсказательных инструментов, окончательная верификация потенциальных мишеней требует экспериментальной проверки в лабораторных условиях.

Мы провели поиск потенциальных мРНК мишеней идентифицированных нкРНК при помощи веб-сервиса TargetRNA3, использующего алгоритм классификации на основе градиентного бустинга², который обучался на тысячах выявленных взаимодействий между малыми РНК и их регуляторными мишенями в различных прокариотах. Для каждой выявленной нами транс-кодируемой нкРНК, за исключением Ms1, мы предсказали вторичную структуру (приложение К) и идентифицировали ряд потенциальных мРНК мишеней (приложение Л).

Больше всего мРНК мишеней было предсказано для двух нкРНК - ncMSMEG13168 и ncMSMEG15794с - 38 и 63 транскрипта соответственно. Меньше всего (выявлена всего одна мРНК мишень) для нкРНК ncMSMEG10069с, ncMSMEG10373В, ncMSMEG11192 и ncMSMEG15379.

Существует 51 мРНК, которые являются мишенью для двух разных нкРНК, и 3 мРНК (*MSMEG_0883*, *MSMEG_4974*, *MSMEG_0688*), которые являются мишенью одновременно для трех разных нкРНК. То, что одна мРНК может быть мишенью для нескольких нкРНК, указывает на возможное наличие множественных путей регуляции для этой конкретной мРНК. Это может обеспечить бактерии гибкостью в реагировании на различные условия или стрессовые факторы, позволяя ей быстро и эффективно адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Также стоит учитывать, что взаимодействие многих регуляторов с одной мишенью может обеспечить усиление или, наоборот, подавление экспрессии целевого гена в зависимости от комбинации присутствующих нкРНК.

Между предсказанными мишенями мРНК и выявленными транс-кодируемыми нкРНК также был проведен корреляционный анализ и идентифицированы гены, экспрессия которых обладает как минимум средней ($r < -0,5$) негативной корреляцией с транскрипцией соответствующих нкРНК (Рисунок 18). Необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев, в парах мРНК-нкРНК наблюдается снижение экспрессии целевого гена и повышение экспрессии соответствующей малой РНК в течение первых часов действия низких температур. К 24 часам, часть генов восстанавливает свою экспрессию.

² алгоритм машинного обучения для задач регрессии и классификации

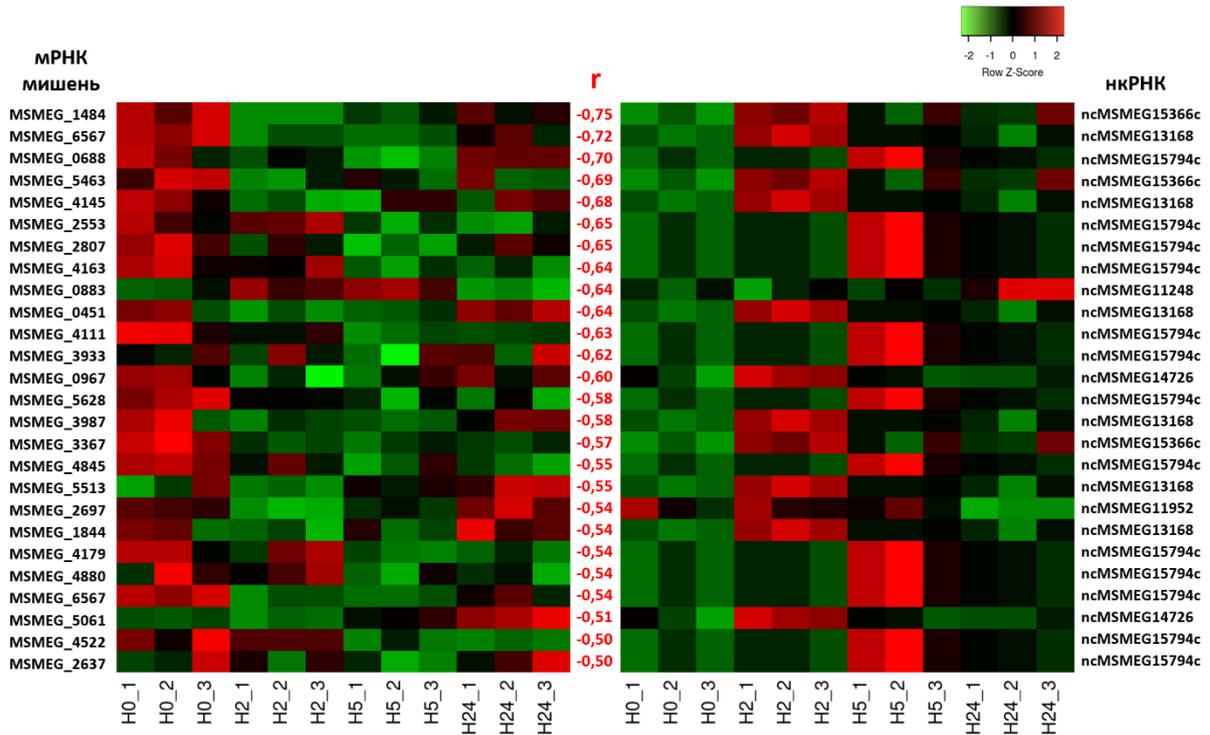


Рисунок 18 – «Тепловые» карты, представляющие изменение экспрессии в динамике холодового стресса выявленных транс-кодируемых нкРНК и их мРНК мишеней с коэффициентом корреляции r меньше $-0,5$; цветом обозначены нормализованные значения экспрессии (Z-score); коэффициенты корреляций для каждой пары мРНК-нкРНК расположены в центральной колонке; представлены результаты секвенирования трех независимых биологических репликатов для каждой временной точки

Предсказанные мишени включают в себя мРНК генов, продукты которых участвуют в метаболизме аминокислот, транспортеры, транскрипционные регуляторы и белки, участвующие в ремоделинге мембраны. Транскриптомный анализ показал, что в этих процессах происходят глобальные изменения при адаптации бактерии к низким температурам. Таким образом, можно предположить, что активные в период адаптации нкРНК будут участвовать в регуляции описанных процессов. Предсказанные нами взаимодействия создают основу для понимания регуляции адаптивных процессов *M. smegmatis* к холодовому стрессу. Однако их экспериментальное подтверждение остается задачей для будущих исследований.

Единственной из обнаруженных нами транс-кодируемых РНК, для которой ранее была показана функция в *M. smegmatis*, является Ms1 (ncMSMEG16173). Количество этой нкРНК возрастает примерно в 4 раза после 24 часов воздействия низких температур (Рисунок 19). Ms1 является одним из наиболее многочисленных транскриптов нкРНК в стационарной фазе роста *M.*

smegmatis [106]. Она взаимодействует с кором РНК-полимеразы, конкурируя с сигма-факторами, а также участвует в транскрипции β и β' субъединиц РНК-полимеразы [105], тем самым контролируя транскрипционную активность клеток. Наиболее важным физиологическим эффектом Ms1 является консервация пула молекул РНК-полимеразы, который может быть использован клеткой при реактивации из стационарной фазы. Накопление транскриптов Ms1, по всей видимости, является еще одним способом регуляции экспрессии генов (в дополнение к описанной гибернации рибосом и транскрипционной репрессии рибосомных белков) и подчеркивает схожесть процессов адаптации к низким температурам и стационарной фазе.

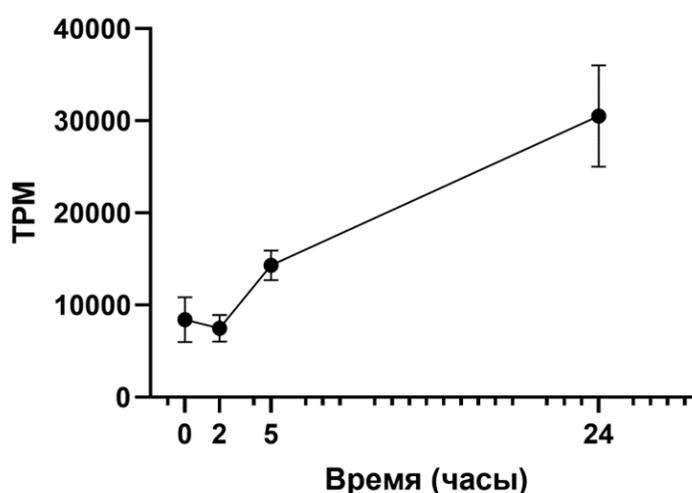


Рисунок 19 – Транскрипция малой некодирующей РНК Ms1 в динамике холодного стресса; транскрипция отображена в нормализованных значениях TPM (Transcripts per million)

Несмотря на то, что ответ на холодовой стресс у бактерий изучается с 60-х годов прошлого века [138; 139], информации об участии регуляторных РНК в этом процессе в научной литературе практически нет. Известно, что адаптация к низким температурам задействует РНК-структуры известные как РНК-термометры (или РНК-сенсоры), которые часто располагаются 5'-НТО мРНК транскриптов и в ответ на температурные изменения изменяют свою конформацию, что приводит к изменению экспрессии соответствующего гена [140]. Один из наиболее известных примеров РНК сенсоров, который чрезвычайно важен для ответа на холодовой стресс, располагается в 5'-НТО транскрипта *cspA*. При снижении температуры, этот сенсор претерпевает структурную перестройку, который значительно увеличивает эффективность трансляции мРНК [141].

Редким примером транс-кодируемой РНК, которая принимает участие в адаптации к холодовому стрессу, является *dsrA* *E. coli*. Низкие температуры стимулируют транскрипцию *dsrA*,

которая, в свою очередь, активирует экспрессию сигма-фактора стационарной фазы роста *rpoS* и нескольких других генов [142; 143].

В 2012 году было обнаружено, что низкие температуры индуцируют транскрипцию 6 нкРНК у морских цианобактерий *Synechococcus*, что предположительно указывает на их роль в адаптации [144].

Наше исследование является первым систематическим описанием некодирующего транскриптома *M. smegmatis* в условиях низких температур. В ходе работы было выявлено 43 цис-кодируемых, и 13 транс-кодируемых нкРНК, из которых ранее было описано только 5. Для них были предсказаны вторичные структуры и предложены потенциальные мРНК мишени. Результаты корреляционного анализа позволяют предположить, что некоторые нкРНК могут принимать участие в ответе на холодостресс, ингибируя экспрессию ряда генов для сохранения энергии. Также был впервые описан транскриптомный ответ микобактерий в условиях низких температур в динамике и выявлены процессы, происходящие при адаптации.

3.2 Роль малой РНК F6 в переходе *M. smegmatis* в состояние покоя

F6 – малая некодирующая РНК, является консервативной у многих микобактерий - как патогенных, так и свободноживущих видов. Была впервые обнаружена и подтверждена в *M. tuberculosis* [88]. Показано, что повышение транскрипции этой малой РНК у *M. tuberculosis* наблюдается при неблагоприятных для клетки условиях: в окислительном и кислотном стрессах, гипоксии, макрофагальной инфекции и недостатке питательных веществ [88; 145]. На основании этих данных нами было предположено, что F6 должна играть важную роль в адаптации микобактерий к стрессам, и была поставлена задача изучить влияние, а также выявить молекулярные механизмы действия этой нкРНК в *M. smegmatis*.

3.2.1 Влияние гена нкРНК *M. smegmatis* F6 на фенотип бактерии в нормальных условиях

Для определения функционального значения и потенциальной регуляторной роли нкРНК F6, нами был создан мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией гена этой малой РНК (далее - ΔF6). Для его конструирования был использован стандартный для микобактерий метод сайт-направленного мутагенеза с использованием шаттл-вектора p2NIL/pGOAL [110]. Данный метод

использует процесс гомологичной рекомбинации и состоит из двух этапов: на первом этапе происходит интеграция шаттл-вектора в область генома, фланкирующую deletируемый ген, а на втором происходит эксцизия этой генетической конструкции, один из вариантов которой предполагает направленное вырезание шаттл-вектора с захватом deletируемой области. Отбор клонов на каждом этапе проводится при помощи специальных селективных питательных сред. Общая схема данного этапа работы представлена на Рисунке 20.

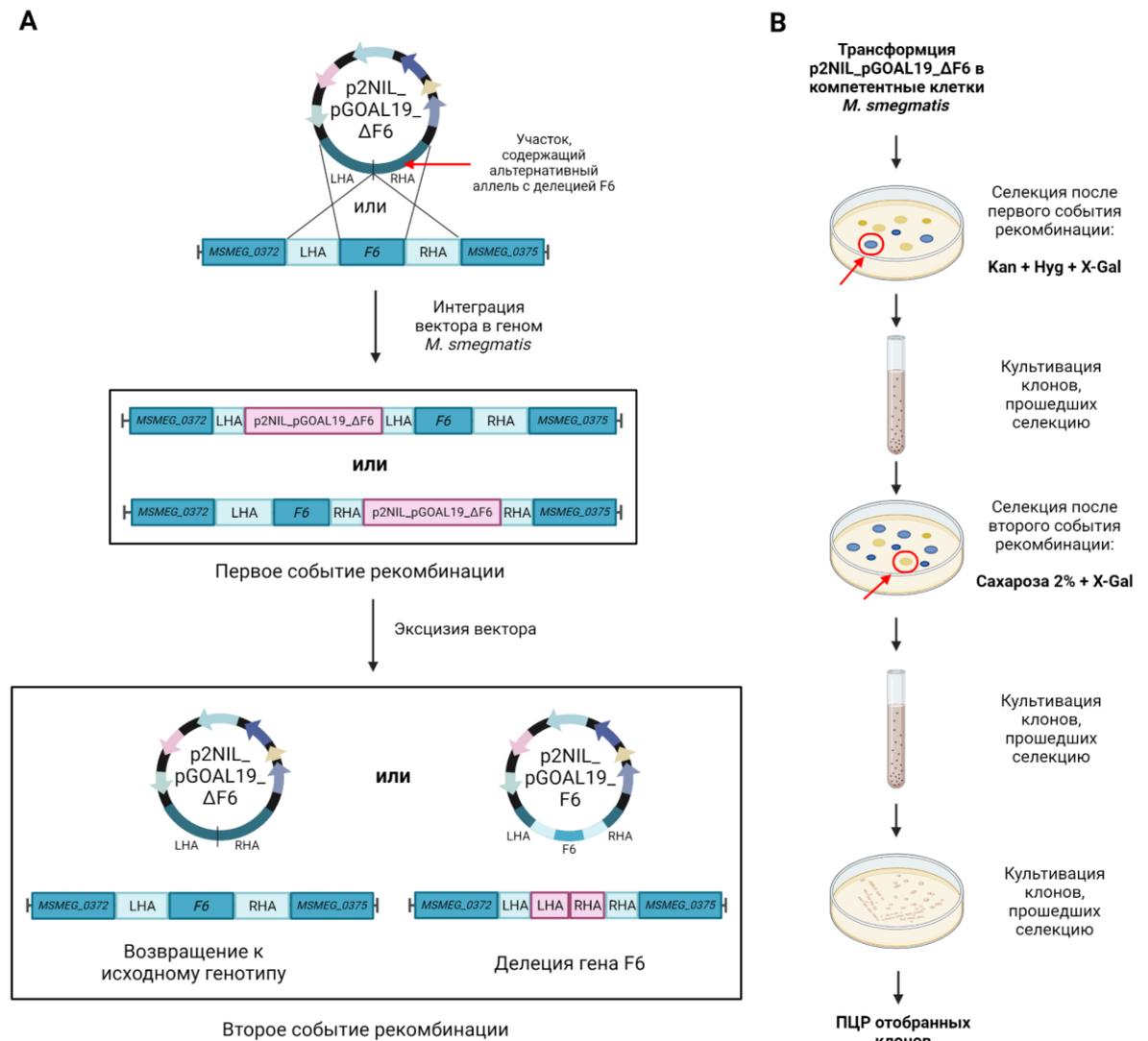


Рисунок 20 – Создание штамма *M. smegmatis* с делецией гена нкРНК F6. (A) Схематичное изображение молекулярных событий двухстадийной стратегии мутагенеза; RHA, LHA (Right/Left homologous allele – правый/левый гомологичный аллель) – обозначения фланкирующих ген F6 последовательностей ДНК, расположенных справа и слева от него соответственно; (B) Последовательность этапов селекции *M. smegmatis* в ходе получение штамма с делецией гена нкРНК F6

Подтверждение делеции гена после второго этапа селекции было проведено при помощи метода ПЦР (Рисунок 21) с последующим секвенированием амплифицированного продукта по методу Сэнгера. Выбранный клон $\Delta F6$ имел делецию в области 417,720–417,885 п.н. согласно аннотации генома *M. smegmatis* в Mycobrowser [117].

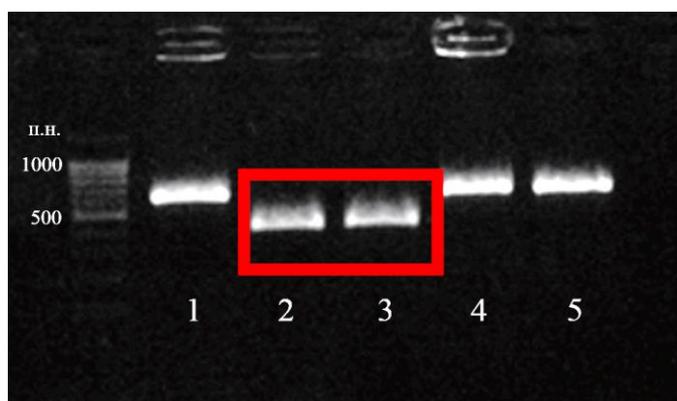


Рисунок 21 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной области, содержащей ген малой РНК F6 клонов *M. smegmatis*, прошедших оба этапа селекции; красной рамкой выделены продукты, соответствующие клонам, в которых ген F6 делетирован

Полученный штамм $\Delta F6$ не демонстрировал отличий в скорости роста по сравнению со штаммом дикого типа *M. smegmatis* (далее MSM_WT) (Рисунок 22). Однако с помощью метода световой микроскопии было обнаружено, что штамм $\Delta F6$ в ранней логарифмической фазе роста в жидкой питательной среде проявляет повышенную склонность к агрегации по сравнению с культивируемым штаммом (Рисунок 23), что может свидетельствовать об изменении состава клеточной стенки при делеции гена F6.

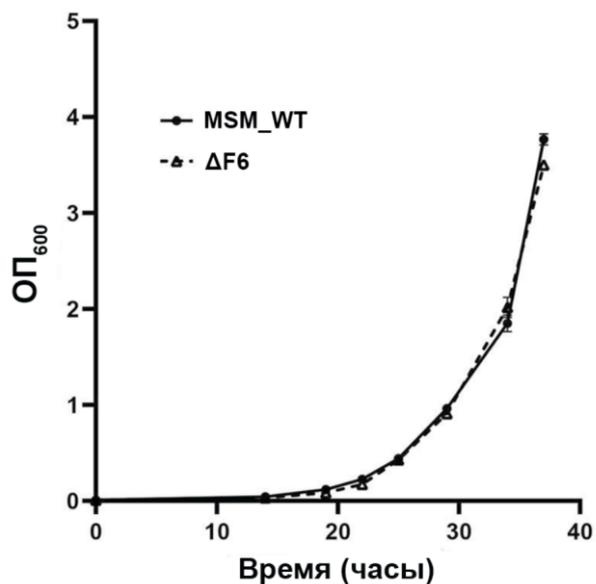


Рисунок 22 – Кривые роста штамма дикого типа (MSM_WT) и делеционного мутанта по гену F6 (Δ F6) *M. smegmatis*; данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов

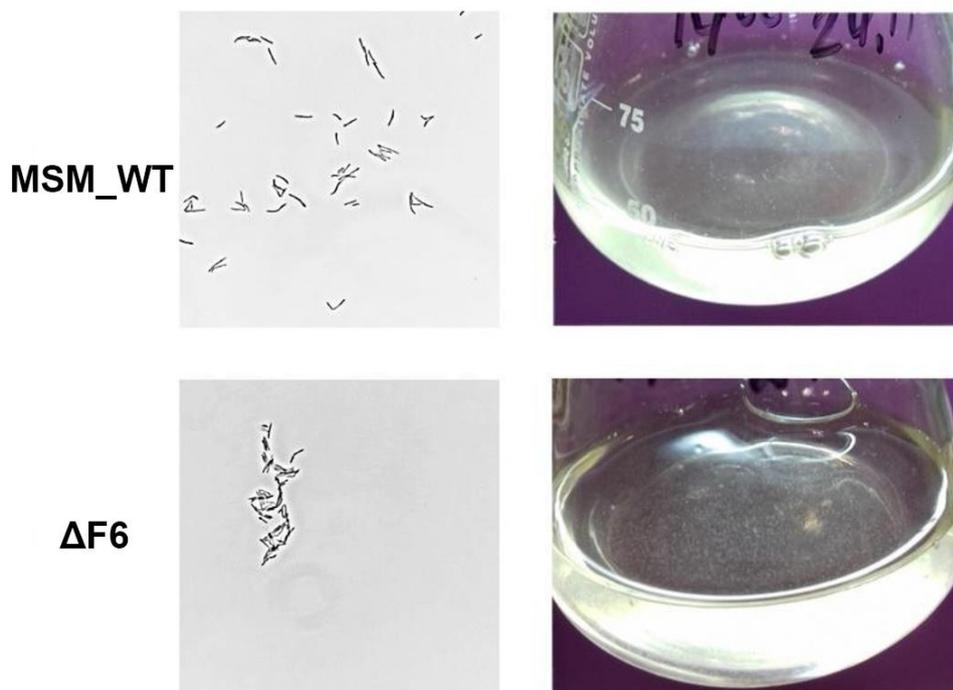


Рисунок 23 – Световая микроскопия бактерий *M. smegmatis* в ранней логарифмической фазе роста штамма дикого типа (MSM_WT) и делеционного мутанта по гену F6 (Δ F6); увеличение $\times 1250$ (слева) и изображение культур штаммов в жидкой питательной среде (справа)

3.2.2 Делеция F6 вызывает изменения в экспрессии ряда генов *M. smegmatis*

Для того, чтобы выявить метаболические пути *M. smegmatis*, на которые малая РНК F6 может оказывать влияние, было проведено массовое параллельное секвенирование транскриптомов штаммов $\Delta F6$ и MSM_WT в средней логарифмической фазе роста ($OP_{600} \sim 1,0$), в биологическом трипликате. В ходе анализа было выявлено 15 генов, которые статистически значимо повысили свою экспрессию в штамме $\Delta F6$ по сравнению с культивируемым штаммом (Рисунок 24; Приложение М).

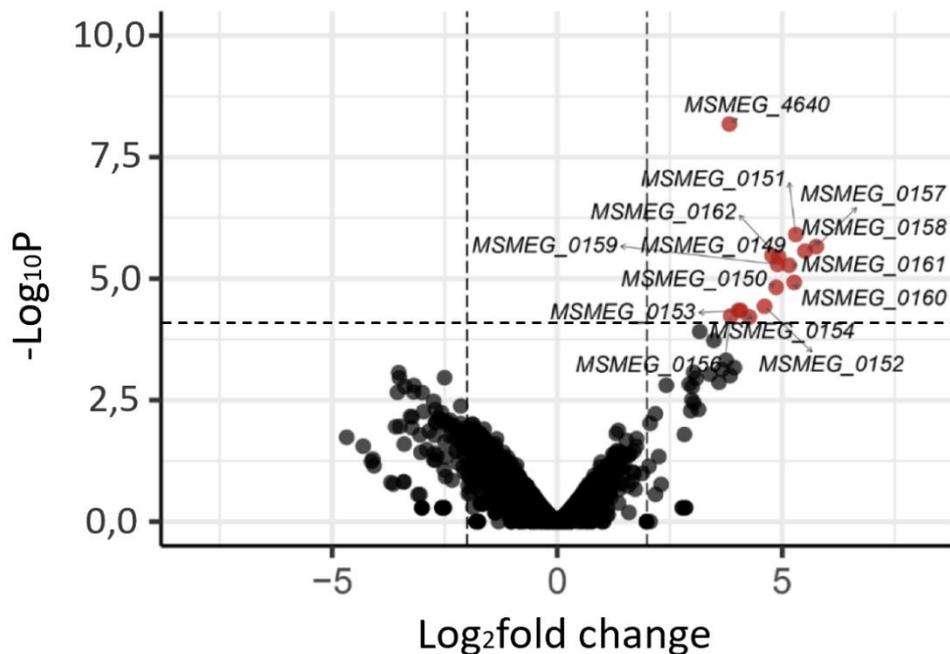


Рисунок 24 – Диаграмма Volcano, отображающая дифференциальную экспрессию генов в штамме *M. smegmatis* $\Delta F6$ относительно штамма MSM_WT. Статистически достоверно дифференциально экспрессированные гены ($\text{Log}_2\text{FC} > 2,0$, $\text{FDR} < 0,05$) выделены красным цветом.

Эти гены могут быть разделены на 2 крупных кластера, располагающихся в одном геномном локусе: *MSMEG_0156-MSMEG_0162*, *MSMEG_0149-MSMEG_0152* (Рисунок 25) и отдельно расположенный ген *MSMEG_4640*.

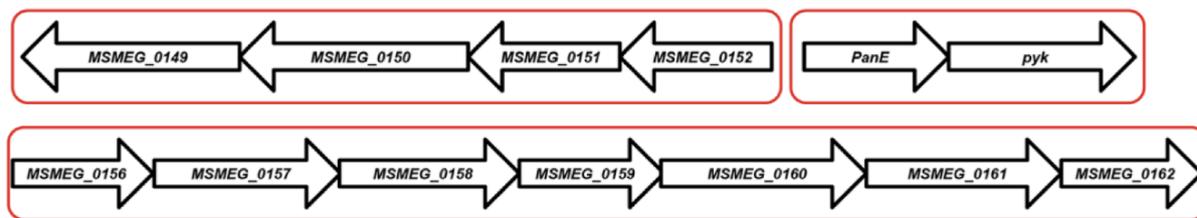


Рисунок 25 – Схема расположения двух кластеров генов в геноме *M. smegmatis*, экспрессия которых возрастает в *M. smegmatis* $\Delta F6$

Первый кластер (*MSMEG_0156-0162*) включает в себя ряд генов, вовлеченных в метаболизм формиата. Среди них можно отметить продукт *MSMEG_0157*, который отвечает за утилизацию оксалата, токсичного для *M. smegmatis* метаболита [146]. Гомолог *MSMEG_0157* у *M. tuberculosis* входит в категорию генов, необходимых для роста бактерии [147].

Другой ген этого оперона, *MSMEG_0156*, кодирует транскрипционный регулятор семейства LysR, гомолог которого у *M. tuberculosis* контролирует ответ микобактерии на окислительный стресс путем подавления экспрессии генов каталаз-пероксидазы (*katG*) и алкил-гидроксипероксидредуктазы (*ahpC*). Гиперэкспрессия гена этого транскрипционного фактора приводит к более чувствительному к пероксидам фенотипу [148].

Второй кластер включает в себя гены *MSMEG_0149-0152*, среди которых можно выделить ген протонной помпы PntAB (*MSMEG_0151*), которая участвует в адаптации бактерии к кислотному и окислительному стрессам [149].

Для подтверждения того, что выявленные изменения в экспрессии генов, связаны именно с эффектом, возникшим в результате делеции гена нкРНК F6, был создан комплементированный штамм ($\Delta F6:F6$), в котором ген F6 был встроен в геном $\Delta F6$ штамма в составе инсерционного вектора pMV306 под контролем сильного микобактериального промотора *rrnB*. Для проверки отсутствия влияния самого вектора, был создан дополнительный штамм $\Delta F6:pMV306$, в геном которого была интегрирована плаزمид без гена F6. Восстановление экспрессии гена F6 в комплементированном гене было подтверждено с помощью метода нозерн-блота (Приложение Н).

Случайным образом было отобрано несколько генов (*MSMEG_0149*, *MSMEG_0150*, *MSMEG_0157*, *MSMEG_0162*, *MSMEG_4640*), для которых было показано изменение экспрессии при делеции гена F6. При анализе экспрессии этих генов методом количественной ОТ-ПЦР в штаммах MSM_WT и $\Delta F6$ были подтверждены данные транскриптомного профилирования (Рисунок 26). Для комплементированного штамма было зафиксировано возвращение экспрессии к уровням, близким к WT штамму.

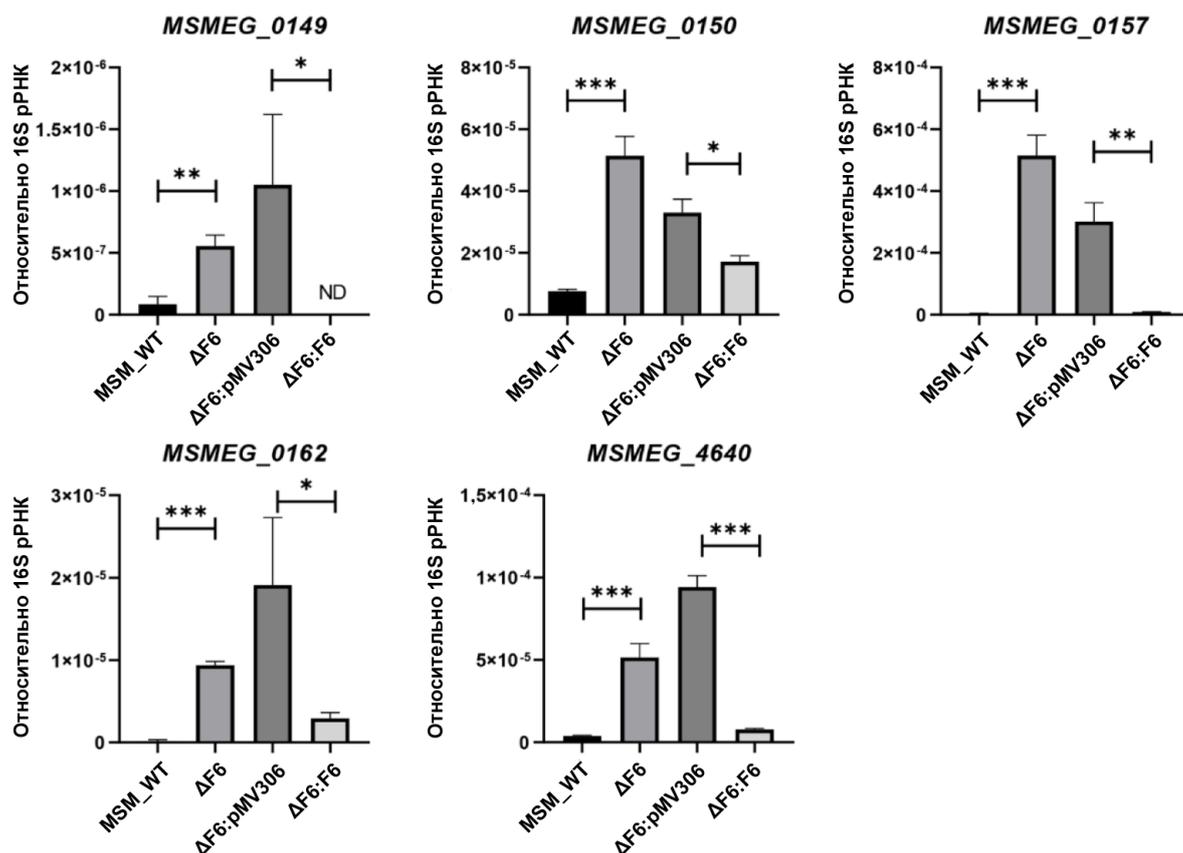


Рисунок 26 – Подтверждение дифференциально экспрессируемых генов методом количественной ОТ-ПЦР; экспрессия всех генов была нормализована на 16S рРНК; $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, ND – транскрипция не детектирована

3.2.3 мРНК *MSMEG_4640* является прямой молекулярной мишенью малой РНК F6

Как было отмечено в главе 1.2, одним из самых оптимальных методов поиска молекулярных мишеней бактериальных малых РНК является комбинация транскриптомного профилирования и *in silico* методов, позволяющих предсказать потенциальные мРНК, которые способны взаимодействовать с исследуемой нкРНК. Для поиска мишеней малой РНК F6 мы использовали программу CopraRNA [125], которая определяет вероятность спаривания малой РНК и с каждой мРНК бактерии на основании их нуклеотидных последовательностей и вторичных структур, а затем составляет ранжированный список наиболее вероятных мРНК-мишеней. Особенностью данной программы является также то, что она использует данные не только исследуемого организма, но и близкородственных видов для увеличения точности предсказания.

Анализ списка предсказанных мРНК мишеней для F6 (приведен в приложении П) показал, что одна из потенциальных областей взаимодействия располагается в 5'-НТО мРНК гена *MSMEG_4640* (Рисунок 27), повышение экспрессии которого было отмечено при сравнении транскриптомов MSM_WT и Δ F6 штаммов.

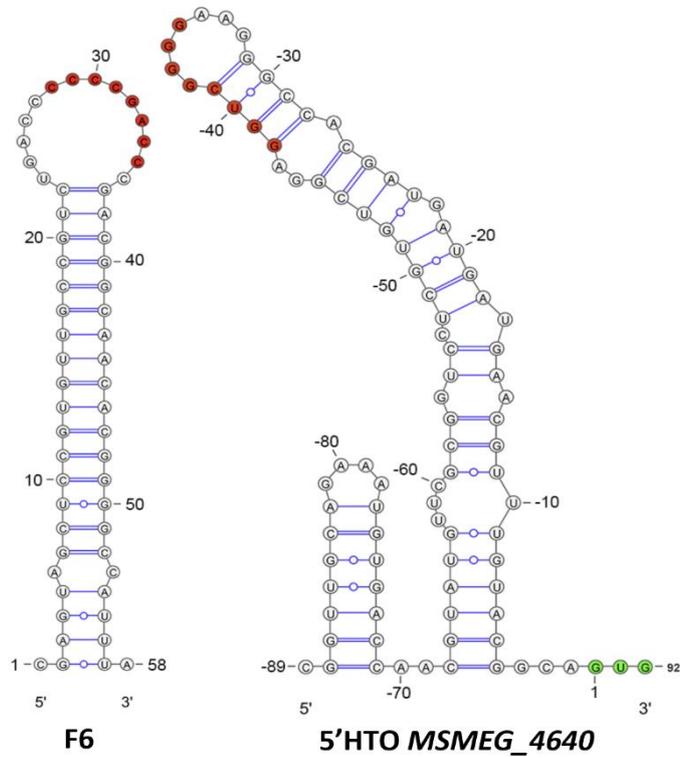


Рисунок 27 – Вторичные структуры малой РНК F6 и 5'-НТО *MSMEG_4640*; нуклеотиды предсказанной области взаимодействия выделены красным цветом; старт-кодон мРНК выделен зеленым цветом

Анализ транскриптомного профиля подтвердил, что мРНК *MSMEG_4640* действительно содержит 5'-НТО длиной ~90 нуклеотидов (Рисунок 28).

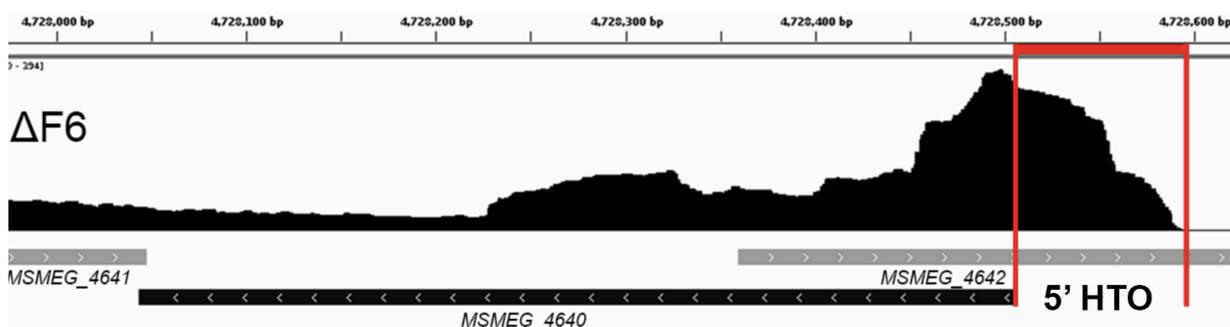


Рисунок 28 – Визуализация покрытия секвенирования локуса генома *M. smegmatis*, которая содержит ген *MSMEG_4640*; для визуализации были использованы данные РНК-секвенирования штамма $\Delta F6$; 5'-НТО обозначена красными вертикальными линиями

Вторичная структура этого участка складывается в петлю в районе -30 – -38 нуклеотидов от старт-кодона, которая содержит 8-нуклеотидную область, комплементарную петле F6 (Рисунок 27).

Следующим шагом стало экспериментальное подтверждение прямого взаимодействия малой РНК F6 и 5'-НТО мРНК *MSMEG_4640*. Для этого на основе инсерционного вектора pMV306 была создана репортерная конструкция, в которой 5'-НТО *MSMEG_4640* была расположена перед кодирующей последовательностью гена *GFP* под промотором микобактериального гена *hsp60* (pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-*GFP*). Последовательность гена малой РНК F6 была лигирована в автономно-реплицирующийся вектор pAMYC под управлением сильного микобактериального промотора *rrnB* (pAMYC-F6).

На основе плазмид pAMYC-F6 и pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-*GFP* мы создали два производных вектора pAMYC-F6mut и pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-mut-*GFP*, в которых в последовательность ДНК предполагаемой области взаимодействия между малой РНК F6 и 5'-НТО *MSMEG_4640* были внесены 3 точечные мутации с помощью коммерческого набора Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB, США) и пар олигонуклеотидов F6-mut-for/F6-mut-for и UTR4640_mut-for/UTR4640_mut-rev соответственно. Мутации были подобраны таким образом, чтобы нарушить проверяемое взаимодействие между F6 и 5'-НТО мРНК *MSMEG_4640* при использовании репортерной системы в комбинациях с одним интактным и одним мутантным векторами (pAMYC-F6/pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-mut-*GFP* или pAMYC-F6mut/pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-*GFP*). При использовании комбинации двух мутантных векторов (pAMYC-F6mut/pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-mut-*GFP*) предполагаемое взаимодействие должно было быть восстановлено (Рисунок 29). Внесенные мутации были проверены с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Полная схема создания векторов pAMYC-F6, pAMYC-F6mut, pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-*GFP* и pMV306-*MSMEG4640*_{5'utr}-mut-*GFP* приведена в Приложении Г.

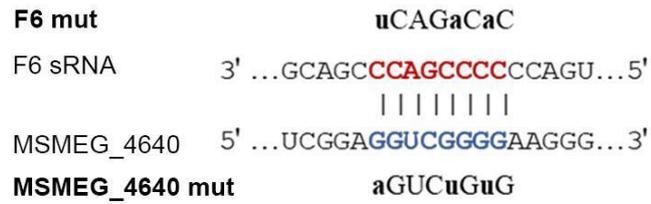


Рисунок 29 – Схематичное представление взаимодействия малой РНК F6 и 5'-НТО *MSMEG_4640*; Введенные в последовательности точечные мутации выделены нижним регистром

Полученные плазмиды в 4 возможных комбинациях, соответствующих вариантам интактного, нарушенного и восстановленного взаимодействия рассматриваемых последовательностей, были трансформированы в штамм *M. smegmatis* ΔF6. Оценка интенсивности флуоресценции клеточных лизатов культур рекомбинантных штаммов показала, что нарушение комплементарности последовательностей — при внесении мутаций в последовательность как малой РНК, так в 5'НТО гена *MSMEG_4640* — приводит к усилению флуоресцентного сигнала (Рисунок 30). Таким образом, внесение мутаций в область взаимодействия препятствует образованию межмолекулярного РНК-РНК дуплекса, тем самым нарушая контроль экспрессии репортерного гена. При использовании обеих мутантных плазмид одновременно взаимодействие восстанавливается, и интенсивность сигнала снижается до исходного уровня.

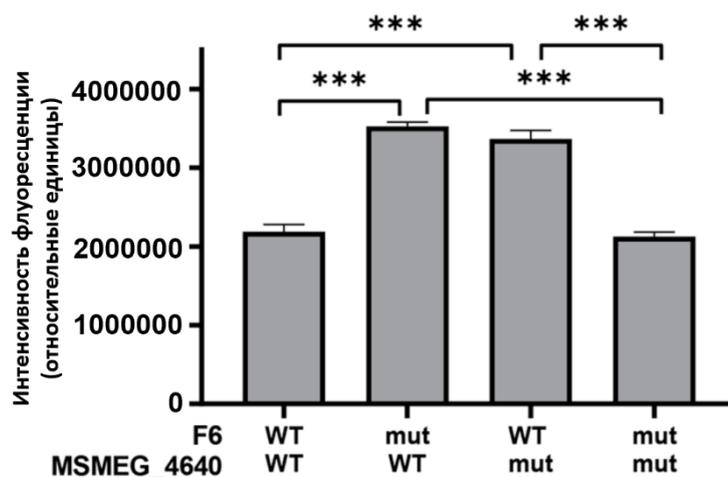


Рисунок 30 – Гистограмма, представляющая результаты экспериментальной оценки взаимодействия малой РНК F6 с 5'-НТО *MSMEG_4640* с использованием различных вариантов репортерной конструкции; обозначение WT маркирует вариант интактной последовательности, mut – мутантный вариант; ***p < 0,001

Этот опыт показывает, что малая РНК F6 напрямую контролирует экспрессию гена *MSMEG_4640*, связываясь с 8-нуклеотидной последовательностью, расположенной в 5'НТО мРНК *MSMEG_4640*.

Вывод о прямом контроле экспрессии *MSMEG4640* с помощью малой РНК F6 был также подтвержден на белковом уровне: вестерн-блоттинг с помощью антител к консервативному домену Rpf показал значительное повышение количества RpfE2 в Δ F6 штамме (Рисунок 31).

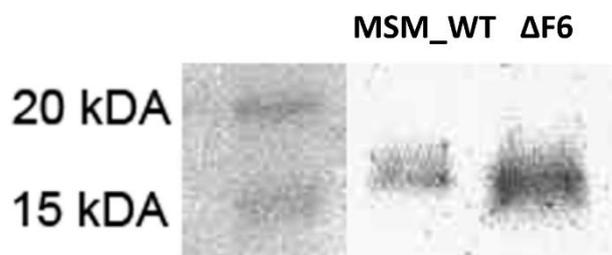


Рисунок 31 – Анализ экспрессии RpfE2 в культурах MSM_WT и Δ F6 методом вестерн-блоттинга с антителами против консервативного домена Rpf; молекулярная масса RpfE2 составляет 15,1 кДа согласно данным Mucobrowser

3.2.4 Делеция гена нкРНК F6 ингибирует переход *M. smegmatis* в состояние покоя

Ранее было показано, что в *M. tuberculosis* транскрипция малой РНК F6 возрастает в условиях кислого и окислительного стрессов [88]. Оценка транскрипции F6 с помощью метода Нозерн-блоттинга в условиях этих стрессов в *M. smegmatis* показала лишь незначительное снижение транскрипции малой РНК в кислых условиях (рН 6,0) и отсутствие изменения при в окислительном стрессе (H_2O_2) (Рисунок 32).

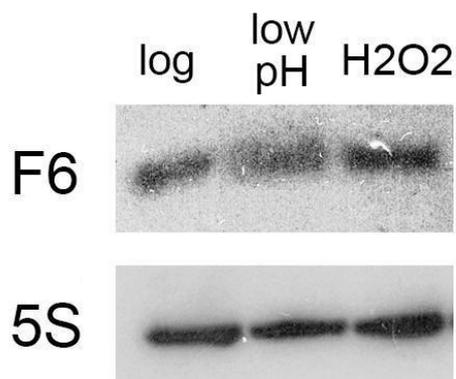


Рисунок 32 – Количество РНК F6 в средней логарифмической фазе роста штамма MSM_WT в условиях кислотного (pH 6,0) и окислительного (H₂O₂) стрессов, определенное методом Нозерн-блота (верхняя панель); в качестве контроля использована 5S РНК (нижняя панель)

Сравнение клеточной культуры штаммов $\Delta F6$ и WT выявило статистически значимое увеличение оптической плотности $\Delta F6$ при росте в условиях окислительного стресса (Рисунок 33). Этот эффект может быть объяснен повышением в $\Delta F6$ штамме экспрессии генов, вовлеченных в ответ на окислительный стресс, и, в частности и гена протонной помпы PntAB (*MSMEG_0151*) [149].

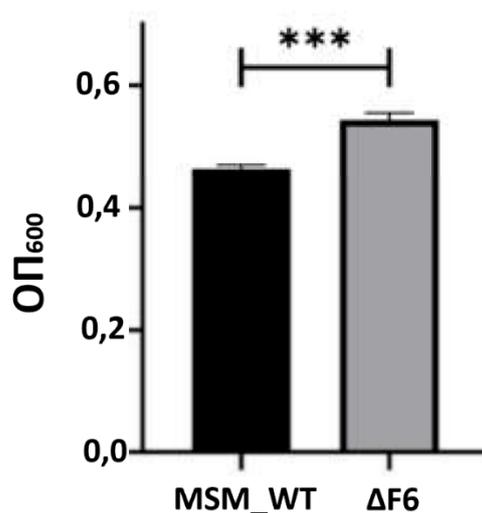


Рисунок 33 – Оптическая плотность жидких культур штаммов MSM_WT и $\Delta F6$ *M. smegmatis* измеренные в условиях окислительного стресса (0,5 мМ H₂O₂); *** p < 0,001

На основании данных транскриптомного профилирования и экспериментов, доказывающих прямое взаимодействие малой РНК F6 и мРНК *MSMEG_4640*, было предположено, что существенное повышение экспрессии *MSMEG_4640* в $\Delta F6$ штамме может повлиять на фенотип бактерии при специфических условиях. Продукт гена *MSMEG_4640* представляет собой белок RpfE2, который относится к семейству факторов ресусцитации Rpf, участвующих в механизмах перехода микобактерий в состояние покоя [150; 151]. Была выдвинута гипотеза о том, что F6 участвует в контроле этого перехода, регулируя экспрессию RpfE2. Оба штамма (MSM_WT и $\Delta F6$) были проверены на способность переходить в некультивируемое состояние, а также на способность к обратному процессу - реактивации. Эти эксперименты были проведены на модели покоя *M. smegmatis*. Культура клеток со сниженной метаболической активностью и неспособных к росту на твердой среде была получена при росте микобактериальной культуры в среде с ограниченным содержанием ионов калия [111].

Оба штамма обладают схожим потенциалом к переходу из состояния покоя в активное (Рисунок 34): статистически значимой разницы в количестве реактивированных клеток между штаммом $\Delta F6$ и штаммом MSM_WT выявлено не было.

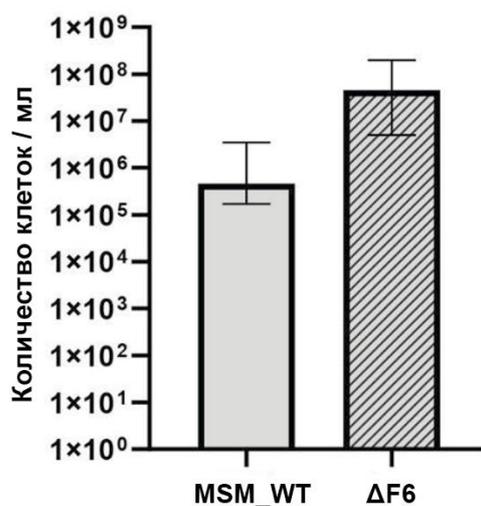


Рисунок 34. Оценка реактивации некультивируемых клеток штаммов MSM_WT и $\Delta F6$ *M. smegmatis* (количество клеток было оценено с помощью метода наиболее вероятного числа (НВЧ) с использованием стандартных статистических таблиц [112])

Однако способность к переходу в некультивируемое состояние у штамма $\Delta F6$ оказалась существенно нарушена по сравнению с контрольным штаммом дикого типа: в модели покоя его КОЕ превышает показатели контрольного штамма (MSM_WT:pMV306, содержит контрольные

вектор без гена малой РНК) более чем в 3 порядка. Комплементированный штамм $\Delta F6:F6$ демонстрирует почти полное восстановление способности переходить в покоящееся состояние по сравнению с $\Delta F6$ штаммом, содержащим контрольный вектор без гена малой РНК (Рисунок 35, Рисунок 36), что свидетельствует о том, что малая РНК F6 действительно вовлечена в процесс перехода в некультивируемое состояние через контроль экспрессии RpfE2. Оценка экспрессии *MSMEG_4640* в этих условиях методом qPCR показала присутствие транскрипта этого гена только в $\Delta F6$ штамме (Приложение P).

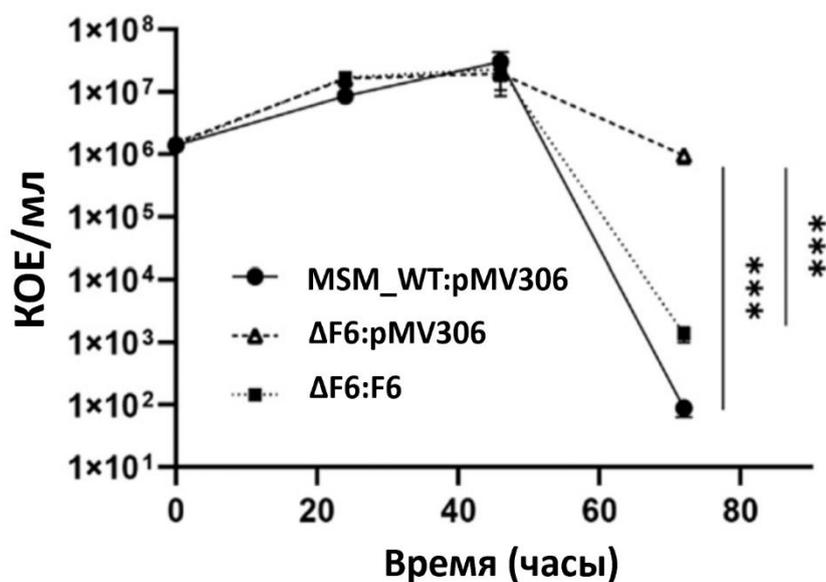


Рисунок 35 – Оценка числа колониеобразующих единиц (КОЕ) штаммов MSM_WT:pMV306, $\Delta F6:pMV306$ и $\Delta F6:F6$ *M. smegmatis* в питательной среде с ограниченным содержанием ионов калия; *** $p < 0,001$

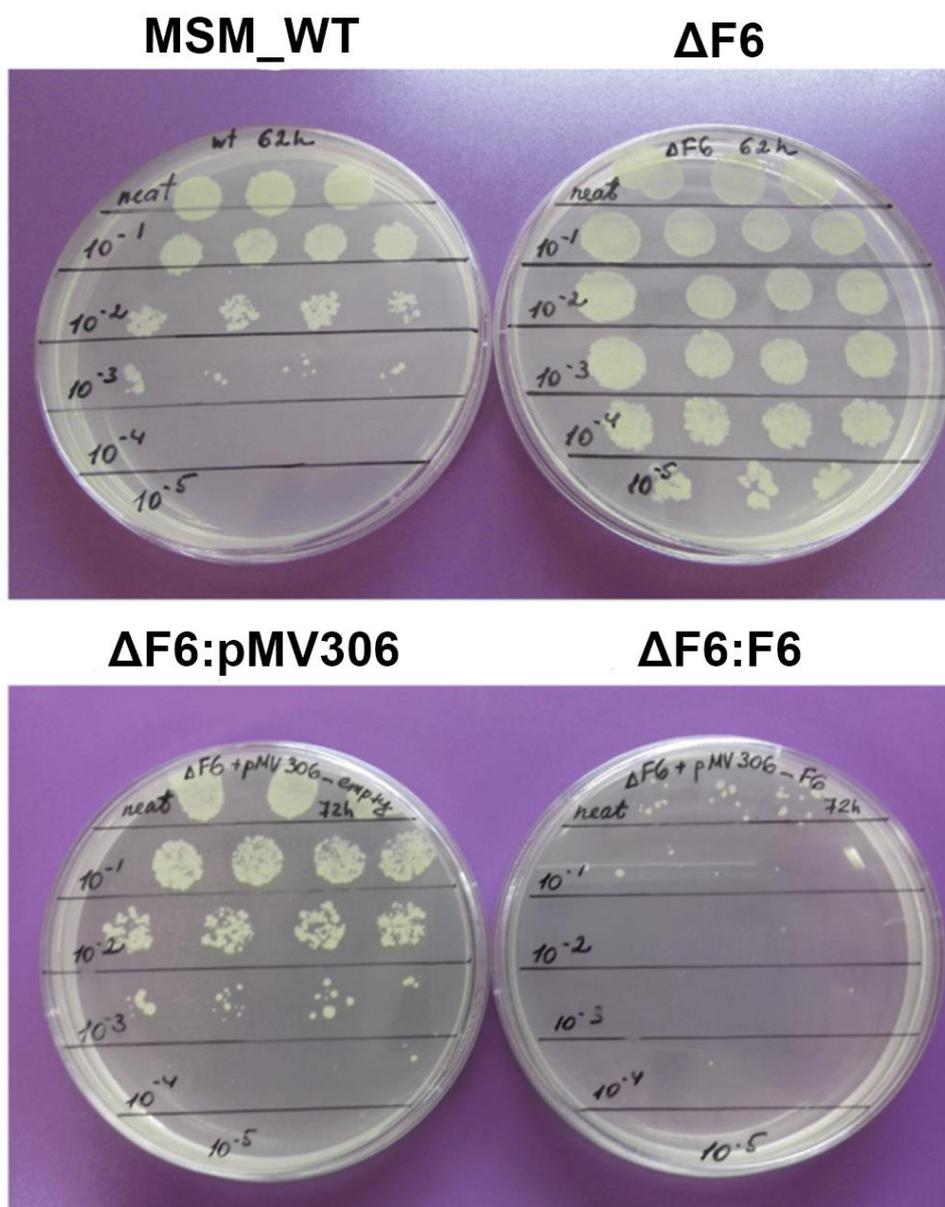


Рисунок 36 – Визуальная оценка роста штаммов MSM_WT, $\Delta F6$, $\Delta F6:pMV306$ и $\Delta F6:F6$ в различных разведениях на агаризованной питательной среде после культивации в жидкой среде с ограниченным содержанием ионов калия

F6 – малая РНК, которая консервативна у всех микобактерий, включая *M. tuberculosis*. Параллельно нашим исследованиям, в 2021 году Houghton и соавторы показали, что ген F6 у *M. tuberculosis* находится под контролем транскрипционного фактора SigF и повышает свою экспрессию во время голодания [145]. Предполагается, что F6 может модулировать экспрессию шаперонинов GroES и GroEL2, стимулируя выживание *M. tuberculosis* в грануломах. Тем не менее, доказательств прямого взаимодействия F6 с мРНК генов этих белков на данный момент не существует.

Сравнение промоторных областей гена F6 *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* показало, что у *M. smegmatis* консенсусный сайт связывания (-35 нт) транскрипционного фактора SigF изменен на сайт связывания SigD [152]. У микобактерий повышение экспрессии SigD наблюдается в условиях голодания, а снижение во время гипоксии [153]. Таким образом, регуляцию транскрипции малой РНК F6 еще только предстоит изучить, но в *M. smegmatis* она не зависит от SigF. Результаты нашей работы показывают, что, несмотря на высокую консервативность F6, её функция и молекулярные мишени в *M. smegmatis* отличаются от описанных в *M. tuberculosis*.

Наше исследование также показывает, что одна некодирующая РНК может интегрировать ответ бактерии на разные стрессы, выполняя сразу несколько функций и регулируя разные клеточные процессы. Так, для F6 нами было описано участие этой малой РНК в ответе на окислительный стресс, что выражено в негативной регуляции генов, вовлеченных в защиту от активных форм кислорода. Также было показано, что транскрипция F6 необходима для эффективного перехода *M. smegmatis* в некультивируемое состояние путем прямого контроля экспрессии фактора ресусцитации RpfE2. Переход в некультивируемое состояние является чрезвычайно важным свойством микобактерий, которое позволяет им переживать множество неблагоприятных условий, а F6 — это первая микобактериальная малая РНК, для которой было показано участие в этом процессе. Схематичное изображение действия малой некодирующей РНК F6 приведено на Рисунке 37.

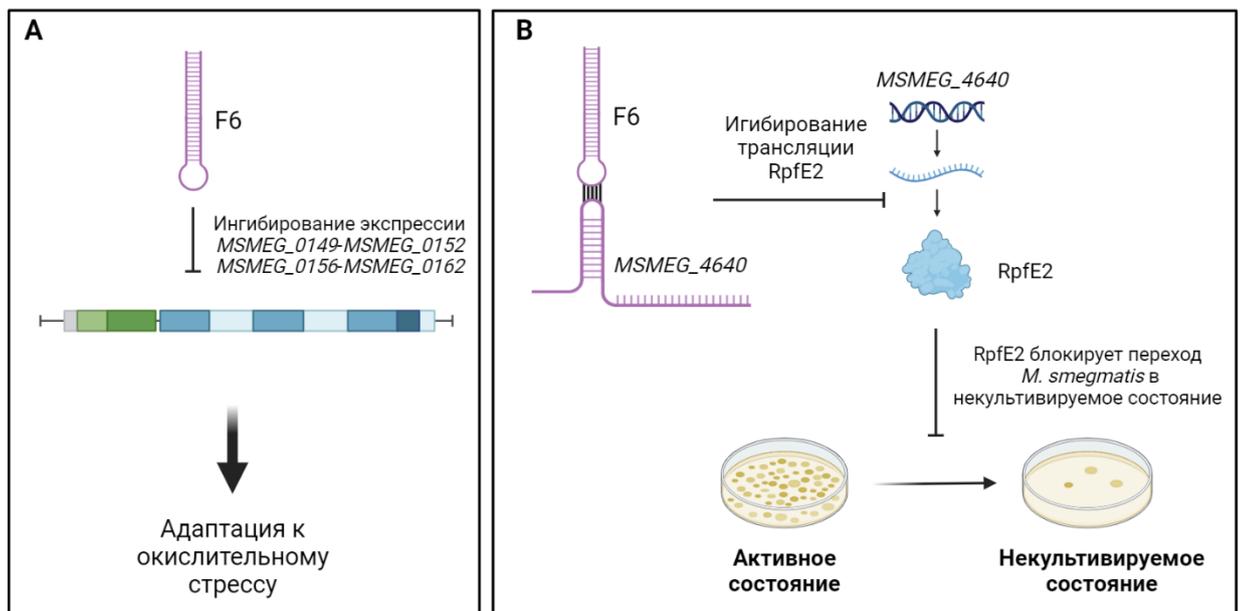


Рисунок 37 – Две роли нкРНК F6 в *M. smegmatis*; (A) Негативная регуляция экспрессии генов адаптации к окислительному стрессу; (B) Регуляция перехода *M. smegmatis* в некультивируемое состояние путем контроля экспрессии фактора ресусцитации RpfE2

3.3 Роль малой РНК MTS1338 в адаптации *M. tuberculosis* к персистированию внутри макрофагов

Известно, что в адаптации бактериальных патогенов к внутриклеточным стрессам участвуют малые некодирующие РНК [65; 154]. Малая нкРНК MTS1338 консервативна и присутствует только у видов, входящих в состав туберкулезного комплекса, что потенциально делает ее специфичным регулятором, специализированным на адаптационных процессах, характерных именно для патогенных микобактерий. В этой связи, изучение функциональной роли MTS1338 может предоставить важную информацию о механизмах, которые патогенные микобактерии используют для выживания и адаптации в условиях внутриклеточного стресса.

3.3.1 MTS1338 накапливается в покоящихся бактериях, но не участвует в процессе реактивации

Ранее было показано, что MTS1338 активно транскрибируется в стационарной фазе, накапливается в бактериях, находящихся в некультивируемом состоянии (состоянии покоя) [155] и в хронической фазе инфекции *in vivo*, что свидетельствует о том, что данная малая РНК может обладать высокой стабильностью в клетках *M. tuberculosis* [156]. Мы решили изучить изменение транскрипции MTS1338 при переходе *M. tuberculosis* из состояния покоя в состояние активного деления и роста (реактивации).

Для проведения эксперимента была использована модель покоящегося состояния при инкубации *M. tuberculosis* в среде с ограниченным содержанием ионов калия [113]. Полученную культуру подвергали процессу реактивации в богатой питательной среде, клетки для выделения РНК были собраны через 24 и 48 часов после начала реактивации. На основе полученных образцов РНК синтезировали кДНК и оценивали транскрипцию MTS1338 методом количественной ОТ-ПЦР. Параллельно был проведен аналогичный эксперимент, в котором перед началом реактивации в питательную среду добавляли антибиотик рифампицин (5 мкг/мл) для ингибирования активности РНК-полимеразы.

Процесс реактивации клеток начинается в течении первых суток, что отражено в увеличении уровня включения урацила (Рисунок 38, А). При этом, деление клеток начинается только после 6 суток инкубации в среде для реактивации (Рисунок 38, А). Количество MTS1338 не изменяется с течением времени в первые дни реактивации (Рисунок 38, В), в том числе и в

условиях инактивации РНК-полимеразы рифампицином, что говорит о том, что в процессе реактивации отсутствует *de novo* синтез этой нкРНК.

Таким образом, MTS1338 характеризуется высокой *in vivo* стабильностью в клетках *M. tuberculosis*. Длительное сохранение некодирующей РНК в клетках, даже при отсутствии её *de novo* синтеза, может служить стратегией быстрого реагирования на изменяющиеся условия окружающей среды, позволяя бактериям моментально реагировать на изменения без необходимости «тратить» ресурсы на дополнительную транскрипцию.

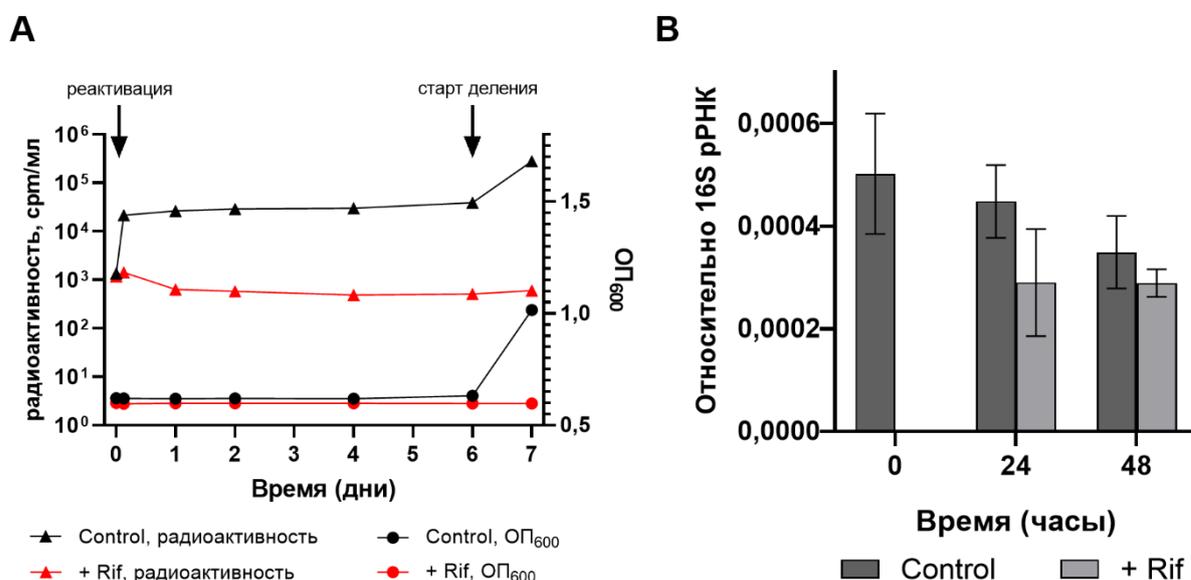


Рисунок 38 – (А) Включение ³Н-урацила (измерения обозначены треугольными символами) и кривые роста (измерения обозначены круглыми символами) при реактивации культуры *M. tuberculosis* из покоящегося состояния без (черный цвет) и в присутствии рифампицина (красный цвет); (В) Оценка уровня транскрипции MTS1338 в процессе реактивации

3.3.2 Пик транскрипции нкРНК MTS1338 в мышинной модели инфекции наблюдается после 10-й недели

Ранее было показано, что некоторые нкРНК *M. tuberculosis*, в том числе MTS1338, активно транскрибируются в мышинных моделях инфекции *in vivo* [90; 104]. На основе этих данных была впервые предположена важность MTS1338 в контексте заболевания. В целях оценки динамики транскрипции MTS1338 во время инфекции, был проведен эксперимент, в ходе которого

генетическая линия мышей C57BL/6 (B6) была заражена штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. C57BL/6 (B6) — это линия мышей, обладающая генетической устойчивостью к туберкулезу, в результате чего у животных развивается хорошо контролируемое хроническое заболевание [157].

В нескольких временных точках заражения из мышинных лёгких выделяли тотальную РНК и оценивали транскрипцию малой РНК MTS1338 с помощью метода количественной ОТ-ПЦР (Рисунок 39, А). Параллельно, гомогенат из мышинных лёгких высевали на агаризованную питательную среду для оценки бактериальной нагрузки на легкие мышей в ходе заболевания (Рисунок 39, В).

Было показано, что транскрипция MTS1338 резко повышается к 10 неделе инфекции, моменту, когда формируется устойчивое хроническое заболевание [158]; после этого транскрипция MTS1338 остается на постоянном уровне, лишь незначительно снижаясь к 54 неделе.

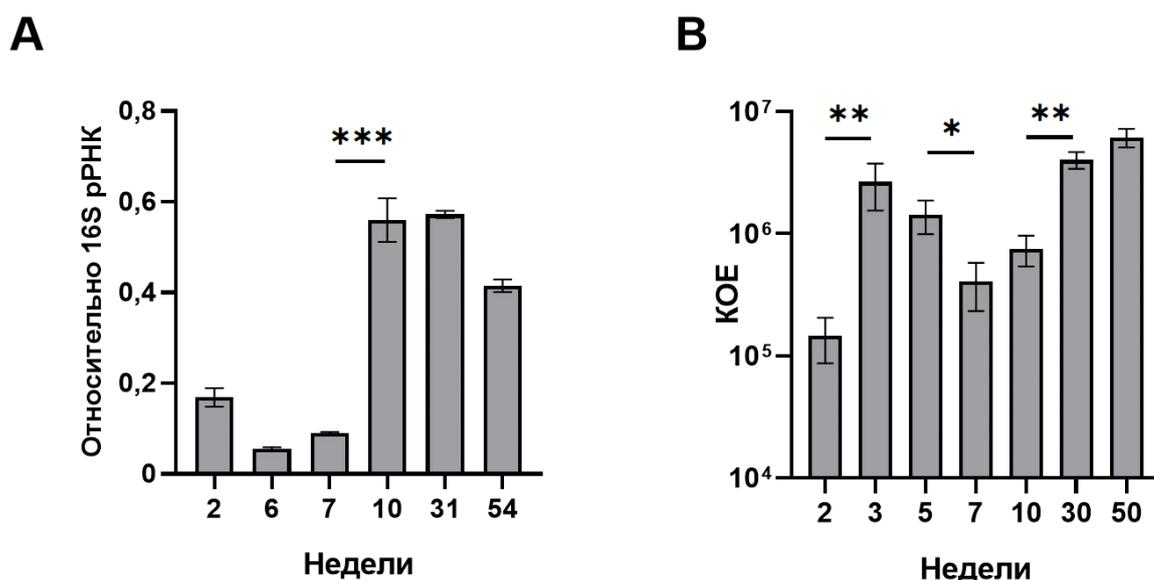


Рисунок 39 – Прогрессия инфекции *M. tuberculosis* H37Rv в резистентных к туберкулезу B6 мышах; (А) Уровень транскрипции MTS1338 в ходе инфекции; (В) Оценка бактериальной нагрузки (КОЕ) в мышинных легких в ходе инфекции; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3.3 Главным индуктором транскрипции MTS1338 *ex vivo* является NO

Результаты заражения показали, что транскрипция малой РНК MTS1338 повышается в хронической фазе инфекции. Одним из ключевых регуляторов формирования эффективного адаптивного иммунного ответа, необходимого для контроля над заболеванием, является

интерферон-гамма (IFN- γ) [159; 160]. Интерферон-гамма — это важный провоспалительный цитокин, который активирует макрофаги, улучшая их способность фагоцитировать и уничтожать патогены, и усиливает презентацию антигенов, путем повышения экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости. Дополнительно, IFN- γ стимулирует адаптивный иммунный ответ, усиливая функции Th1-клеток и активизируя экспрессию интерферон-стимулированных генов (ISGs) для противовирусной защиты. Учитывая принципиальную роль этого цитокина, нами был проведен эксперимент, анализирующий влияние INF- γ на транскрипцию малой РНК MTS1338 в условиях заражения *ex vivo*.

Активированная INF- γ и неактивированная культуры перитонеальных макрофагов мышей линии В6 были заражены штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. В нескольких временных точках (2, 4, 24 часа) заражение останавливали, выделяли РНК и оценивали транскрипции нкРНК MTS1338 методом количественной ОТ-ПЦР. Результаты показали, что во всех точках транскрипция MTS1338 была статистически значимо выше при первоначальной активации макрофагов INF- γ (Рисунок 40).

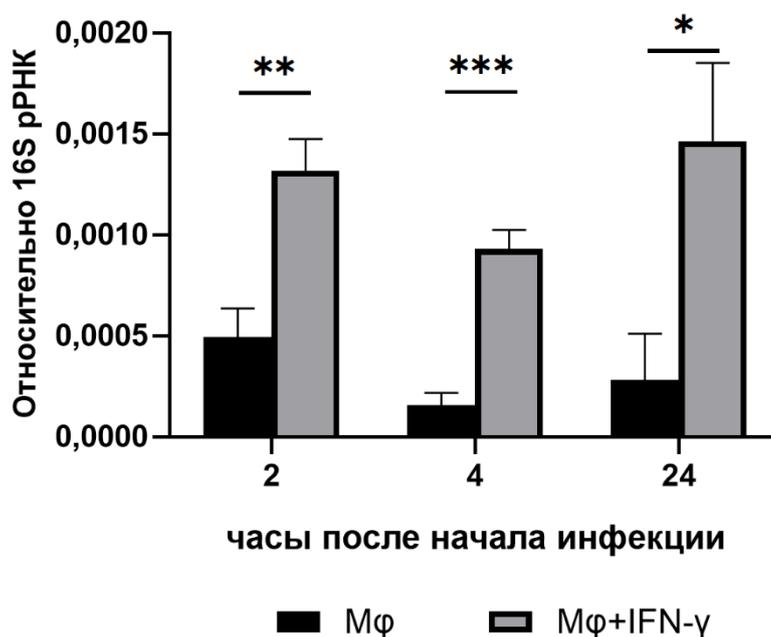


Рисунок 40 – Динамика транскрипции MTS1338 при заражении перитонеальных макрофагов мышей линии В6 при активации INF- γ и без нее; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Ранее было показано, что ген нкРНК MTS1338 находится под контролем DosR, одного из важнейших транскрипционных факторов *M. tuberculosis* [156], который регулирует реакцию на стресс и опосредует переход бактерии в покоящееся состояние [161]. Было установлено, что

индуктором транскрипции MTS1338 *in vitro* является оксид азота (II) (NO) [156], который, наравне с гипоксией, является активатором экспрессии DosR. Однако полная цепь событий, приводящая к транскрипции MTS1338 при инфекции, не была известна.

Синтез производных оксида NO является одной из важнейших стратегий с помощью которой макрофаги проявляют бактерицидную активность [162]. Выработка производных NO зависит от индуцибельной NO-синтазы (iNOS), экспрессия которой, в свою очередь, активируется IFN- γ [163]. Соответственно, было предположено, что повышение уровня транскрипции нкРНК MTS1338 *ex vivo* при активации макрофагов IFN- γ опосредовано NO, произведенным iNOS. Для проверки этой гипотезы активированные IFN- γ и зараженные *M. tuberculosis* макрофаги обрабатывали селективным ингибитором iNOS - L-NIL [N6-(1-иминоэтил)-L-лизина гидрохлорид] и инкубировали 24 часа. Применение ингибитора ведет к полному нивелированию эффекта повышения транскрипции MTS1338, наблюдаемому при активации IFN- γ (Рисунок 41). При этом, L-NIL не оказывает влияния на уровень транскрипции MTS1338 в бактериальной культуре.

Таким образом, дополняя и расширяя известные данные о регуляции транскрипции MTS1338, этот эксперимент демонстрирует, что главным триггером транскрипции MTS1338 в условиях заражения макрофагов *ex vivo* является NO, произведенный iNOS. Последовательность событий, приводящая к транскрипции MTS1338 при инфекции изображена на Рисунке 42.

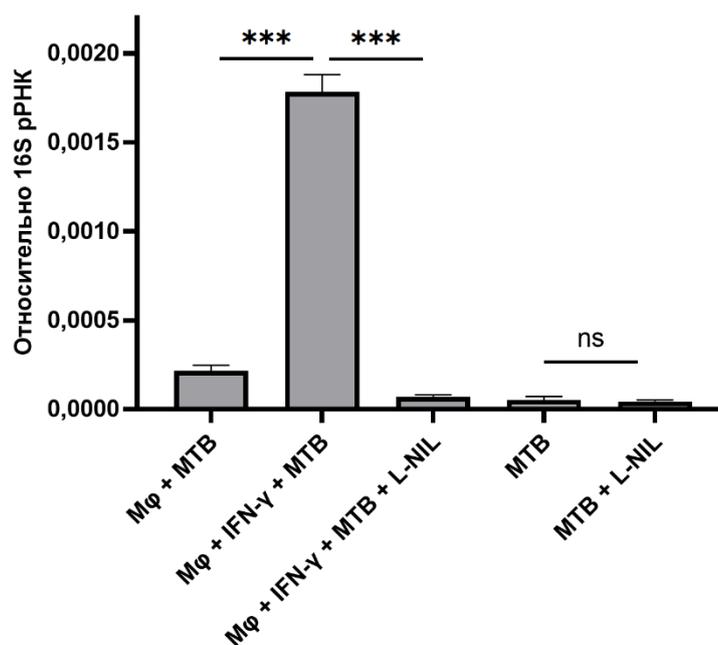


Рисунок 41 – Уровень транскрипции MTS1338 через 24 часа после инфекции: контроль (mφ + MTB), активация IFN- γ (mφ + MTB + INF- γ), активация IFN- γ и обработка L-NIL (mφ +

MTB + INF- γ + L-NIL), бактериальная культура без инфекции (MTB) и бактериальная культура с обработкой L-NIL. *** $p < 0,001$, ns – статистически значимой разницы не обнаружено

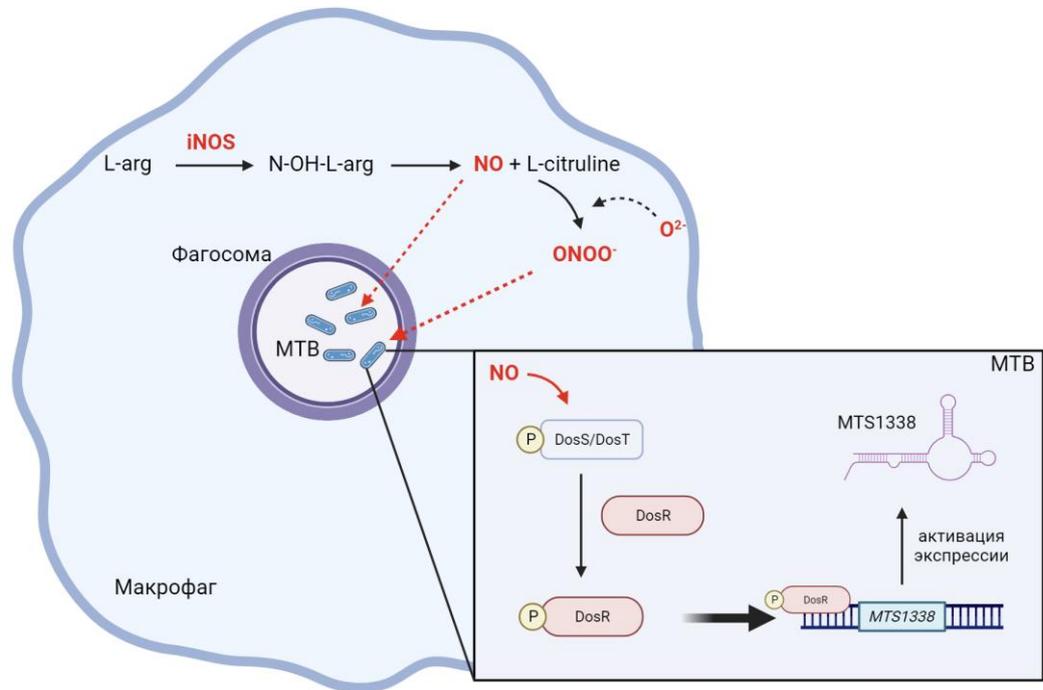


Рисунок 42 – Схематичное изображение последовательности событий, которая приводит к транскрипции MTS1338 в условиях заражения макрофагов *ex vivo*

3.3.4 Гиперэкспрессия малой РНК MTS1338 способствует выживанию *M. tuberculosis* при действии стрессоров *in vitro*

Активация транскрипции MTS1338 в условиях заражения и установленный нами путь индукции её транскрипции свидетельствуют о том, что функция этой некодирующей РНК может быть связана с внутриклеточным выживанием *M. tuberculosis* при действии неблагоприятных условий. Для проверки этого предположения нами был проведен эксперимент, оценивающий влияние повышения уровня транскрипции MTS1338 на выживание *M. tuberculosis* при действии ряда макрофаго-подобных стрессов *in vitro*. Для получения штамма *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующего MTS1338, был использован вектор pMV261, в который был клонирован ген MTS1338 под управлением сильного микобактериального промотора *rrnB* (Приложение Д).

Жидкие культуры штамма *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующего MTS1338 (mtb_pMV261_1338), и контрольного штамма, трансформированного вектором pMV261rrnB (mtb_pMV261_E) инкубировали в трех условиях, моделирующих разные стрессовые

воздействия: кислотный стресс (pH = 5,5), нитрозативный стресс (NO) и окислительный стресс (H₂O₂). Срок инкубации для всех условий составлял 48 часов. Эксперимент был проведен для двух состояний бактериальной популяции *M. tuberculosis* - логарифмической и стационарной фаз роста.

Транскрипционную активность клеток оценивали по уровню включения радиоактивно меченного ³H-урацила. Известно, что уровень включения ³H-урацила обладает сильной положительной корреляцией с количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) [164]. Уровень включения ³H-урацила в штаммах, которые не испытывали стрессовых условий, был установлен как базовый и составлял 100%.

В результате эксперимента было показано, что гиперэкспрессия MTS1338 статистически значимо влияет на выживание *M. tuberculosis* в каждом из стрессирующих состояний как в логарифмической фазе (Рисунок 43, А), так и в стационарной фазе роста (Рисунок 43, В), что выражается в повышении уровня включения ³H-урацила. Выявленное повышение устойчивости к разным стрессирующим состояниям при гиперэкспрессии MTS1338 впервые позволяет классифицировать эту нкРНК как фактор вирулентности, контролирующей механизмы адаптации бактерии к неблагоприятным условиям внутри макрофага.

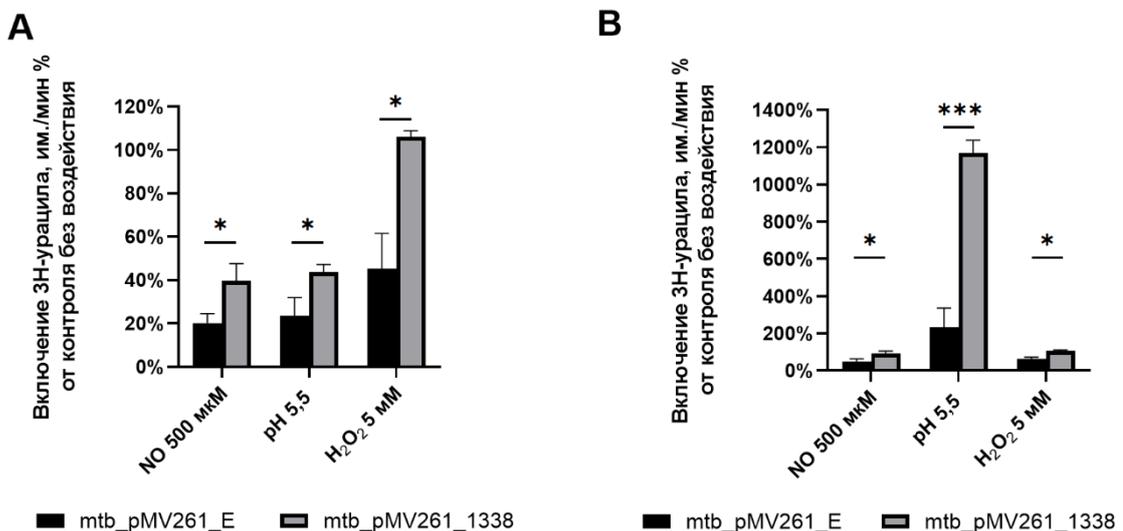


Рисунок 43 – Включение ³H-урацила гиперэкспрессирующим MTS1338 (mtb_pMV261_1338) и контрольным (mtb_pMV261_E) штаммами *M. tuberculosis* в условиях стрессов *in vitro*; (А) Логарифмическая фаза роста; (В) Стационарная фаза роста; *p < 0,05, ***p < 0,001

3.3.5 Гиперэкспрессия MTS1338 в *M. tuberculosis* модулирует экспрессию стресс-специфических генов

Для того, чтобы изучить, как гиперэкспрессия MTS1338 влияет на адаптацию *M. tuberculosis* на уровне транскриптома, нами было проведено транскриптомное профилирование обоих созданных штаммов (mtb_pMV261_1338, mtb_pMV261_E) в условиях изучаемых стрессов. Анализ дифференциальной экспрессии генов показал, что вне зависимости от вида и наличия стресса, гиперэкспрессия MTS1338 приводит к повышению экспрессии 11 генов (Рисунок 44).

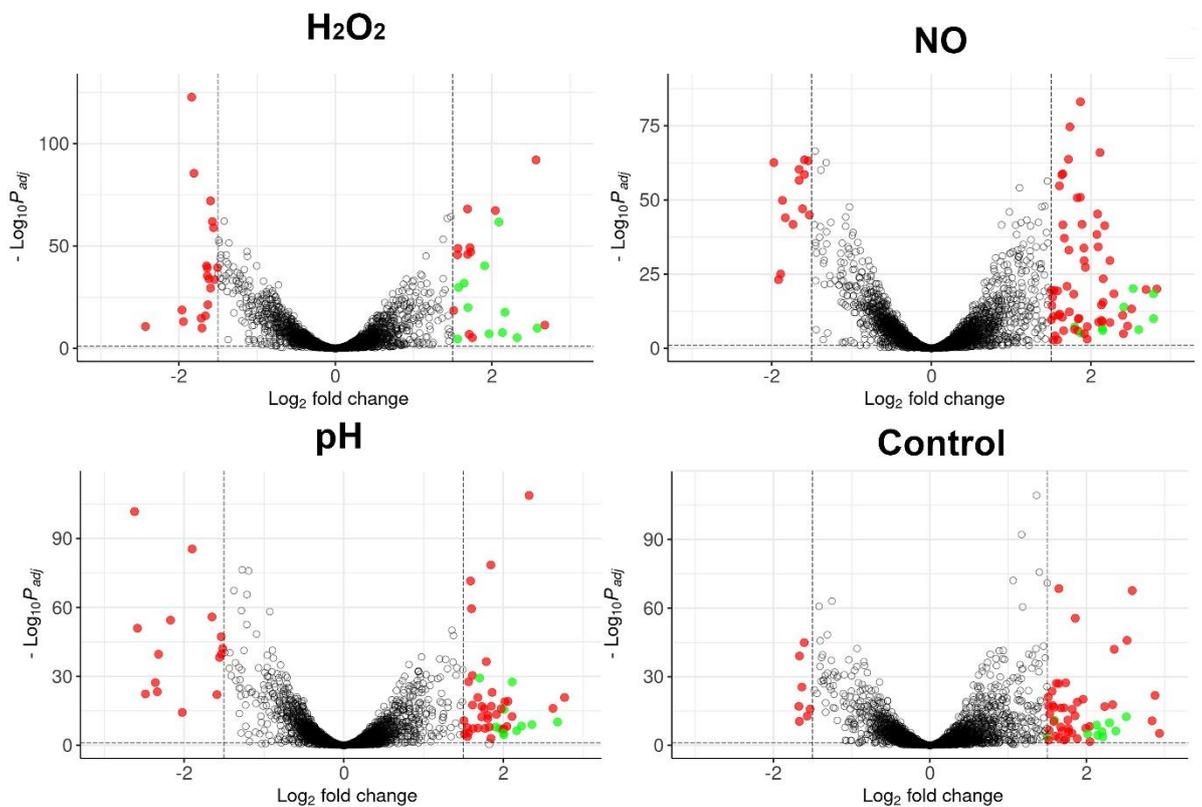


Рисунок 44 – Диаграммы Volcano, отображающие дифференциальную экспрессию генов в каждом из сравнений (штамм mtb_pMV261_1338 против штамма mtb_pMV261_E) во всех анализируемых состояниях; статистически значимо дифференциально экспрессированные гены ($\log_2FC \geq 1,5$, $P_{adj} \leq 0,1$) выделены красным цветом; гены, дифференциальная экспрессия которых была обнаружена во всех состояниях, выделены зеленым цветом

Список этих генов был нами назван MTS1338-специфичной сигнатурой, т.к., по всей видимости, они находятся под прямым контролем MTS1338; их функции связаны с широким спектром адаптации микобактерии к различным стрессам (Таблица 1).

Таблица 1 – Гены MTS1338-специфической сигнатуры, дифференциальная экспрессия которых была детектирована при гиперэкспрессии MTS1338 во всех условиях

Ген	Log ₂ FC				Функция
	Control	pH	NO	H ₂ O ₂	
<i>galK</i>	1,50	2,00	2,15	2,14	Галактокиназа; вовлечена в метаболизм галактозы.
<i>rv0792c</i>	1,59	1,70	1,80	1,97	Транскрипционный фактор, необходимый для нормального развития инфекции и адаптации <i>M. tuberculosis</i> к окислительному стрессу [165].
<i>rv0826</i>	2,38	1,95	2,60	2,32	Консервативный мембранный белок с неизвестной функцией, транскрипция которого находится под контролем металл-чувствительного транскрипционного фактора KmtR [166].
<i>rv1395</i>	2,30	2,01	2,53	1,65	Транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию цитохром Р450-зависимой монооксигеназы [167]; мутации в этом гене приводят к аттенуации штамма в мышинной модели инфекции [168].
<i>cmtR</i>	2,14	2,17	1,88	1,58	Металл-чувствительный репрессор [169]; необходимый для выживания микобактерий в условиях окислительного стресса [170]; участвует в модуляции экспрессии генов другого металл-чувствительного репрессора, Zur, напрямую взаимодействуя с ним [169].
<i>rv2034</i>	3,08	2,68	3,45	2,58	Металл-чувствительный транскрипционный фактор, который участвует в активации транскрипции генов <i>dosR</i> [171] и <i>phoP</i> [172] регулонов, одних из наиболее важных стресс-индуцируемых систем <i>M. tuberculosis</i> .
<i>Rv2035</i>	2,13	1,90	2,41	1,56	Предположительно вовлечен в липидный метаболизм [171]; Структурный гомолог у <i>M. smegmatis</i> участвует в регуляции активности гомолога Rv2034, составляя токсин-антитоксигеновую пару [173].
<i>cadI</i>	2,21	2,00	3,26	2,17	Экспрессия которого индуцируется ионами кадмия [174], меди [175] и цинка [176]; предположительно участвует в механизмах защиты бактерии от токсичности металлов [177].
<i>rv2642</i>	2,20	2,23	2,79	1,91	Металл-чувствительный транскрипционный фактор, который регулирует экспрессию <i>cadI</i> [178] и участвует в механизмах резистентности к антибиотикам [179].
<i>mpt70</i>	2,51	2,36	2,78	2,09	Уникальный антиген <i>M. tuberculosis</i> ; предполагается, что <i>mpt70</i> играет роль в защите микобактерий от иммунного ответа хозяина путем модуляции взаимодействия с клетками макроорганизма [180; 181].
<i>rv3659c</i>	2,02	2,11	1,70	2,14	Консервативный белок с неизвестной функцией.

Анализ дифференциальной экспрессии продемонстрировал, что существуют гены, экспрессия которых отличается между двумя штаммами в каждом конкретном стрессе, а также гены, дифференциальная экспрессия которых была установлена в 2 или 3 различных состояниях (Рисунок 45). Это наблюдение позволяет предположить, что конкретные гены, регулируемые MTS1338, могут зависеть от контекста клеточного состояния. В различных стрессовых условиях активны разные сигнальные пути и транскрипционные программы [182]. Таким образом, гиперэкспрессия MTS1338 может приводить к влиянию последней на разные мишени в зависимости от конкретных условий, что, в свою очередь, будет выражаться в дифференциальной экспрессии разных генов для различных состояний. Списки дифференциально экспрессированных генов, полученных при сравнении штамма с гиперэкспрессией (*mtb_pMV261_1338*) относительно контрольного штамма (*mtb_pMV261_E*) для каждого из исследуемых состояний приведены в Приложении С.

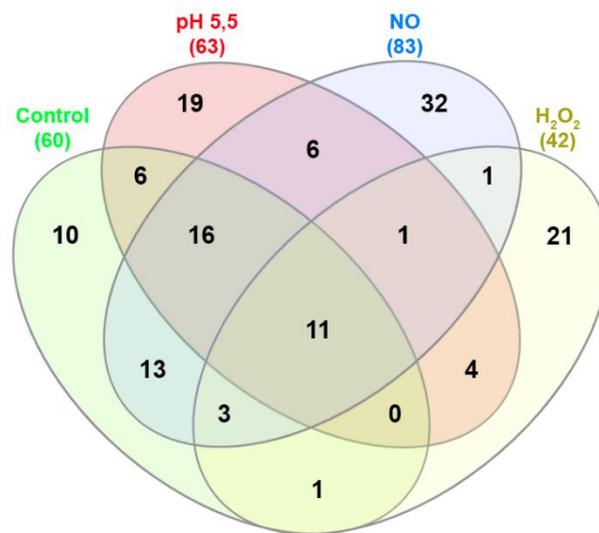


Рисунок 45 – Диаграмма Венна, отображающая общие и уникальные гены, идентифицированные как дифференциально экспрессированные в различных состояниях

Необходимо также отметить, что, влияние каждого отдельного стресса на транскриптом *M. tuberculosis* сильнее, чем влияние фактора гиперэкспрессии MTS1338, что может быть продемонстрировано с помощью анализа главных компонент (Рисунок 46). Выявлена кластеризация проб как по фактору штамма, так и по фактору условий, в которых находились бактерии, но основной вклад в вариабельность данных вносят именно условия, при которых росли штаммы.

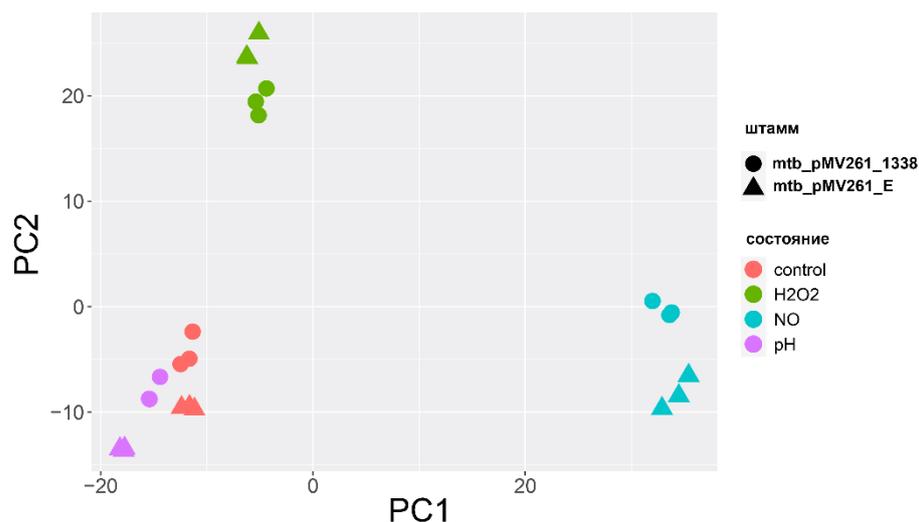


Рисунок 46 – Диаграмма двух главных компонент данных РНК-секвенирования при различных условиях; круглыми маркерами обозначены данные для проб с гиперэкспрессией MTS1338, треугольными - контрольные пробы

Таким образом, можно предположить, что малая РНК MTS1338 служит одним из активаторов адаптивных процессов в бактерии и контролирует экспрессию специфичных генов, участвующих в ответе на различные стрессы, что подготавливает клетку к выживанию в агрессивной среде внутри макрофага. Подтверждением этой гипотезы является также тот факт, что более 50 процентов дифференциально экспрессированных генов в каждом из сравнений совпадает с генами, которые активируется при заражении *M. tuberculosis* культуры перитонеальных макрофагов [183].

3.3.6 Гетерологичная транскрипция малой РНК *M. tuberculosis* MTS1338 в *M. smegmatis* приводит к ингибированию роста

Малая РНК MTS1338 присутствует только у микобактерий, относящихся к туберкулезному комплексу и консервативна у всех его видов; у непатогенного вида микобактерий *M. smegmatis* нет генов, гомологичных гену MTS1338. Тем не менее, нами было найдено, что гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* с помощью рекомбинантной плазмиды pMV261-MTS1338 способствует появлению у штамма ряда фенотипических проявлений, схожих с эффектом гиперэкспрессии MTS1338 в *M. tuberculosis*. А именно, транскрипция MTS1338 (штамм msm_pMV261_1338) замедляет скорость роста *M. smegmatis* по сравнению с контрольным штаммом (msm_pMV261_E), что выражается в отставании кривой роста штамма

msm_pMV261_1338 в жидкой питательной среде (Рисунок 47). Аналогичный результат был впервые описан для *M. tuberculosis* в 2015 году [155]; его повторение в рамках модели *M. smegmatis* косвенно свидетельствует о том, что механизм действия нкРНК MTS1338 может отличаться от классических механизмов бактериальных транс-кодируемых малых РНК.

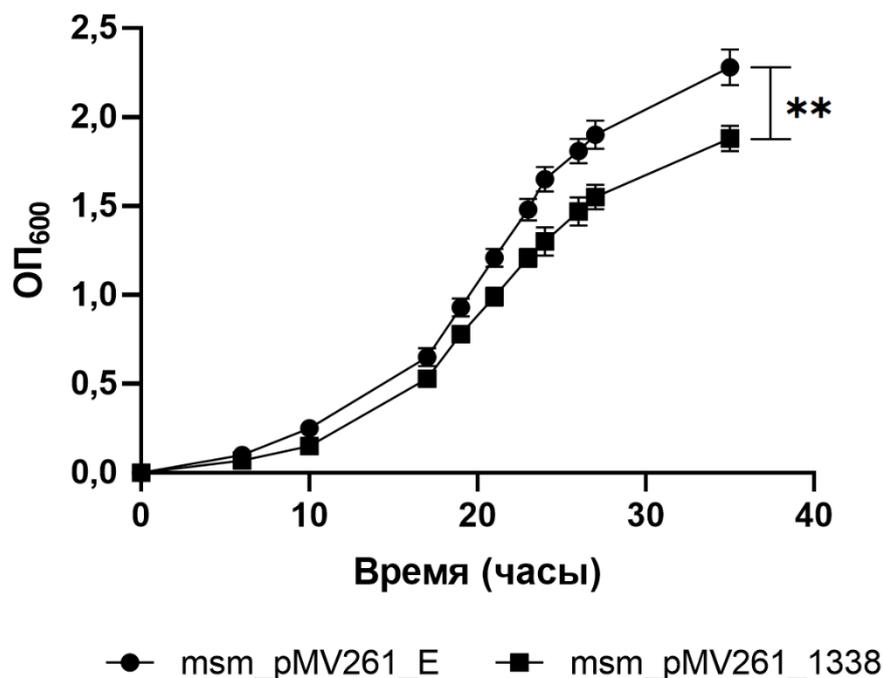


Рисунок 47 – Кривая роста транскрибирующего MTS1338 (msm_pMV261_1338) и контрольного (msm_pMV261_E) штаммов *M. smegmatis* в жидкой среде; ** $p < 0,01$

3.3.7 Гетерологичная транскрипция малой РНК *M. tuberculosis* MTS1338 стимулирует выживание *M. smegmatis* при заражении *ex vivo*

Для того, чтобы выяснить, вызывает ли транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* какие-либо физиологические эффекты, подобные тем, которые гиперэкспрессия этой нкРНК вызывает в *M. tuberculosis*, нами было решено проанализировать выживаемость созданных штаммов (msm_pMV261_1338 и msm_pMV261_E) в условиях инфекции *ex vivo*.

Линию макрофагов мыши RAW264.7 заражали транскрибирующим MTS1338 (msm_pMV261_1338) и контрольным штаммами (msm_pMV261_E) *M. smegmatis*. Через 3 и 24 часа после инфекции заражение останавливали, разрушали эукариотические клетки и высевали

биоматериал на твердую агаризованную среду. Оценку выживаемости производили путем подсчета КОЕ полученных в результате посева.

Эксперимент выявил статистически значимое повышение выживаемости штамма *msm_pMV261_1338* по сравнению с контрольным штаммом, которое наблюдалось в обеих исследуемых временных точках (Рисунок 48). Оценка транскрипции MTS1338 подтвердила наличие транскрипта этой малой РНК в пробах, которые были заражены штаммом *msm_pMV261_1338* (Приложение Т). Эти данные впервые показывают, что транскрипция MTS1338 не только способна повышать выживаемость *M. tuberculosis*, но и обладает аналогичным действием на *M. smegmatis*.

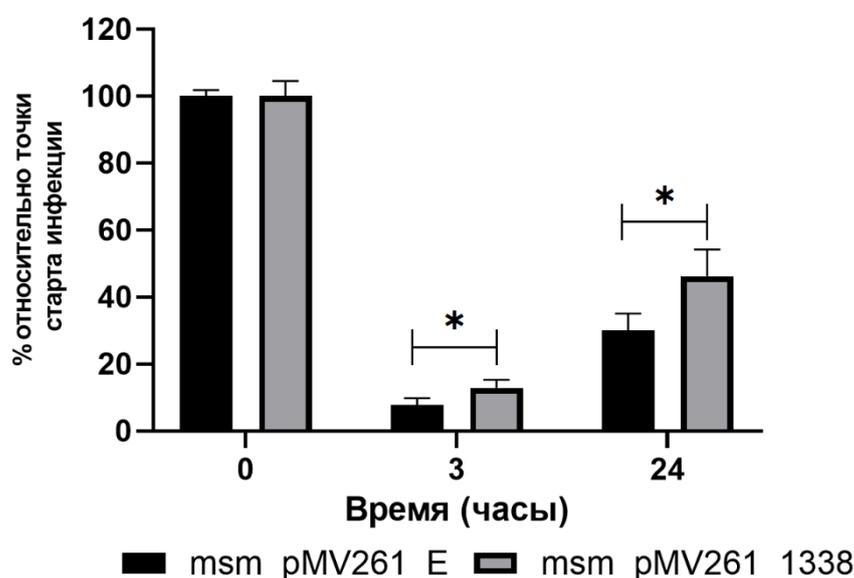


Рисунок 48 – Выживание транскрибирующего MTS1338 (*msm_pMV261_1338*) и контрольного (*msm_pMV261_E*) штаммов *M. smegmatis* при заражении макрофагов линии RAW264.7 (МИ 1:10); КОЕ в нулевой точке принято за 100%; * $p < 0,05$

3.3.8 Гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* ингибирует нормальное созревание фаголизосом

Инфицированные макрофаги уничтожают бактерии в процессе фагоцитоза: они распознают бактериальные клетки с помощью набора специальных рецепторов, поглощают их и лизируют [184]. Однако *M. tuberculosis* выработал молекулярные механизмы, останавливающие образование фаголизосом [185]. Для того, чтобы изучить, одинаково ли идет процесс образования

фаголизосом в случае транскрибирующего MTS1338 и контрольного штаммов *M. smegmatis*, была оценена колокализация микобактерий и маркера созревания фагосом LAMP-1 [186]. Для визуальной оценки бактерий, оба штамма предварительно были трансформированы генно-инженерной конструкцией для конститутивной экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP (pMV261-GFP). Процесс образования фаголизосом был зафиксирован при заражении каждым из штаммов. Однако, в случае штамма, транскрибирующего нкРНК MTS1338 (msm_GFP_pMV261_1338), колокализация LAMP-1 и микобактерий была статистически значимо снижена по сравнению с контрольным штаммом (msm_GFP_pMV261_E) (Рисунок 49, Рисунок 50).

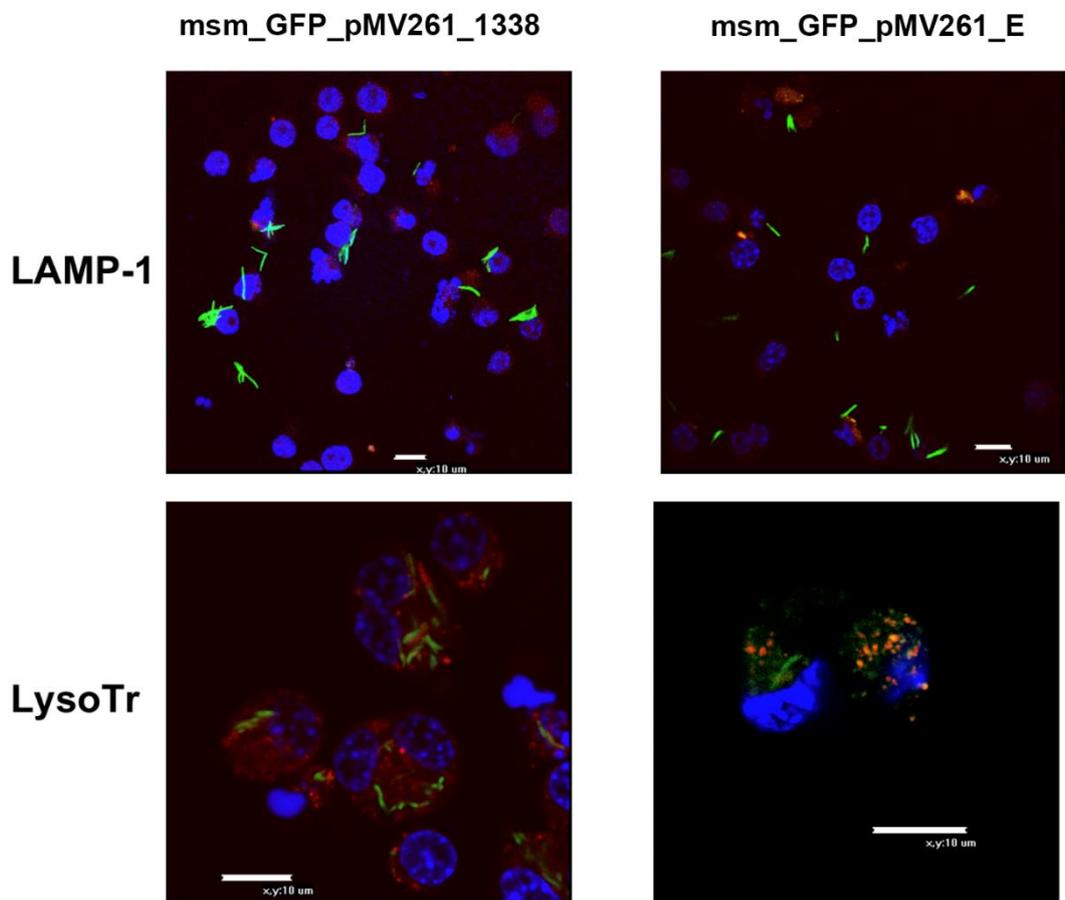


Рисунок 49 – Фотографии, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, демонстрирующие инфекцию макрофагов линии RAW 264.7 двумя штаммами *M. smegmatis*: транскрибирующим MTS1338 (msm_GFP_pMV261_1338) и контрольным (msm_GFP_pMV261_E); оба штамма экспрессируют GFP (зеленый цвет); ядра макрофагов окрашены голубым. LAMP-1 (верхняя панель) и LysoTracker (нижняя панель) окрашены красным цветом; колокализация микобактерий и LAMP-1/кислых компартментов окрашена оранжевым

Дополнительным экспериментом, направленным на верификацию полученных результатов, стало окрашивание кислых компартментов эукариотических клеток флуоресцентным красителем (LysoTracker) при аналогичном заражении указанными штаммами *M. smegmatis*. В результате также было показано снижение колокализации микобактерий, транскрибирующих MTS1338 и фаголизосом (Рисунок 50).

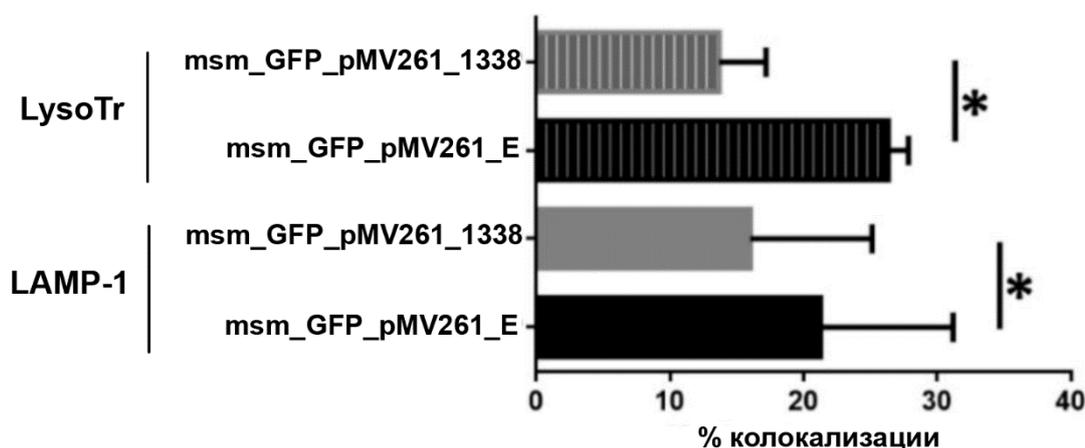


Рисунок 50 – Количественная оценка колокализации микобактерий штаммов msm_GFP_pMV261_1338 и msm_GFP_pMV261_E с LAMP-1 и LysoTracker; * $p < 0,05$

Таким образом, транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis*, препятствует нормальному созреванию фаголизосом путем снижения уровня закисления этих органелл. По всей видимости, именно этот процесс обеспечивает повышенную устойчивость транскрибирующего MTS1338 штамма при заражении макрофагов.

3.3.9 Малая РНК MTS1338 модулирует экспрессию цитокинов в инфицированных макрофагах

Мы также проверили влияние транскрипции MTS1338 в *M. smegmatis* на баланс цитокинов при инфекции. Для этого была оценена транскрипция генов нескольких провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, TGF- β), которые часто обсуждаются в контексте туберкулеза [187; 188].

В ходе эксперимента макрофаги линии RAW264.7 были заражены штаммом *M. smegmatis*, транскрибирующим малую РНК MTS1338 (msm_pMV261_1338) и контрольным штаммом

(msm_pMV261_E). В определенных временных точках (4 и 24 часа), эксперимент останавливали, из культуры выделяли РНК и оценивали транскрипцию генов методов количественной ОТ-ПЦР.

Транскрипция *IL-4* не была детектирована ни в одном из образцов макрофагов. Транскрипция цитокинов *IL-1 β* , *IL10*, *IL12*, *TGF- β* и *TNF- α* была статистически значимо меньше в макрофагах, инфицированных штаммом *M. smegmatis*, транскрибирующим MTS1338 в обеих временных точках. Транскрипция *IL-6*, напротив, была повышена в культуре, зараженной транскрибирующим MTS1338 штаммом, при почти недетектируемом уровне в случае контрольного штамма (Рисунок 51).

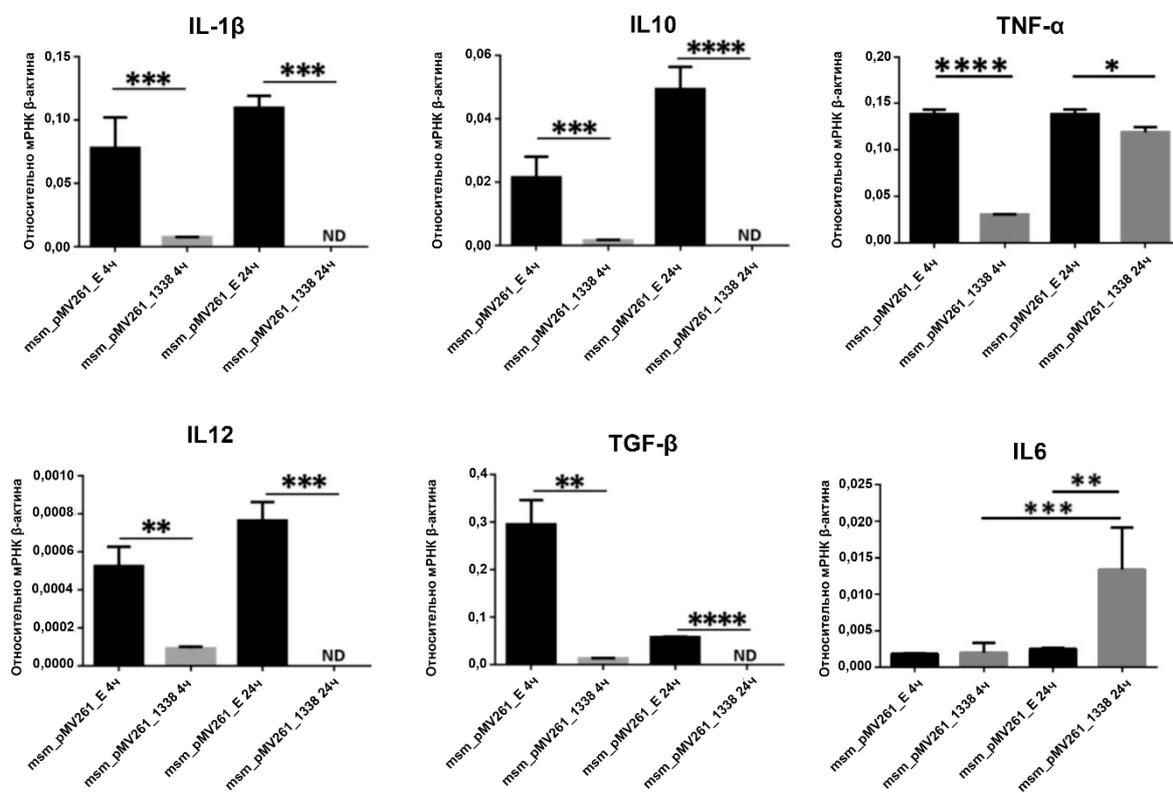


Рисунок 51 – Транскрипция цитокинов относительно бета-актина в макрофагах, инфицированных штаммом *M. smegmatis*, транскрибирующим MTS1338 (msm_pMV261_1338), и контрольным штаммом (msm_pMV261_E); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.3.10 MTS1338 влияет на экспрессию транскрипционных факторов *M. smegmatis* и белков, вовлеченных в ремоделинг клеточной стенки

Для того, чтобы найти факторы, приведшие к обнаруженным эффектам транскрипции MTS1338 на *M. smegmatis*, был проведен масс-спектрометрический анализ протеомов штамма *M. smegmatis*, транскрибирующего MTS1338 (msm_pMV261_1338) и контрольного штамма (msm_pMV261_E). Среди всего массива идентифицированных белков (3602 белка), 109 были уникальными для штамма, транскрибирующего MTS1338, и 117 для контрольного штамма (Приложение У).

Среди уникальных для транскрибирующего MTS1338 штамма белков был обнаружен целый ряд транскрипционных факторов, таких как LacI, MarR, TetR, GntR, Ethr, FurA, DeoR и несколько регуляторов семейства WhiB. Также была зафиксирована экспрессия SigE, альтернативного сигма-фактор с экстраклеточной функцией, вклад которого в вирулентность был показан для *M. tuberculosis* [189].

Были обнаружены 2 из 10 компонентов системы секреции ESX-3, EccA3 и EccE3. Остальные компоненты этой системы не были детектированы ни в одном из штаммов. Остальные белки, которые были индуцированы транскрипцией MTS1338, включают в себя несколько членов семейства цитохромов P450, которые необходимы для выживания *M. tuberculosis* и вовлечены в регуляцию метаболизма стеролов [134]. Также были обнаружены белки синтеза микобактериальной клеточной стенки, такие как поликетидсинтазы, PKS_KS-домен-содержащий белок и синтаза микоцерозной кислоты.

Среди белков, которые были детектированы только в контрольном штамме, были в основном транскрипционные факторы (ArsR, GntR, HxlR, IclR, LacI, LuxR, LysR, PadR, TetR, и семейство XRE), транспортеры (такие, как коимпортер пролина и натрия), консервативные трансмембранные белки и ряд других трансмембранных белков.

3.3.11 MTS1338 стимулирует секрецию белков, вовлеченных в механизмы вирулентности и клеточной проницаемости

У микобактерий известно большое число секретлируемых белков, которые участвуют в модуляции иммунного ответа организма хозяина. Для того, чтобы определить, влияет ли MTS1338 на секрецию каких-либо белков, был проведен масс-спектрометрический анализ секретомов обоих штаммов. Было обнаружено, что в секретоме штамма *M. smegmatis*,

транскрибирующего MTS1338 (*msm_pMV261_1338*), есть 10 белков, которых нет у контрольного штамма (*msm_pMV261_E*). Среди них:

- Белок, содержащий домен SGNH_hydro является гомологом Rv0518 *M. tuberculosis*, который принадлежит к семейству липаз. Было показано, что экспрессия *rv0518* в *M. smegmatis* изменяет морфологию клетки и состав липидов клеточной стенки, увеличивая в ней долю димиколатов трегалозы. Это влияет на устойчивость бактерии к внешним, внутриклеточным и антибиотическим стрессам, повышая выживаемость микобактерий при заражении [135].
- Белок Dacb2 - предполагаемая D-аланил-D-аланин карбоксипептидаза; эти белки играют важнейшую роль в пептидогликановой сшивке и контролируют экспрессию поверхностных гликопептидолипидов, которые могут участвовать в маскировке фосфатидил-мио-инозитол маннозидов от распознавания Toll-подобным рецептором 2 [136].
- Секретируемый белок A0R455, содержащий трансгликозилазный домен, гомологичен белку RpfA *M. tuberculosis*, так называемому «фактору ресусцитации», который стимулирует выход микобактерий из покоящегося состояния [99].
- Антиген MTB48 является гомологом белка EspB *M. tuberculosis*, который секретируется с помощью ESX-1 и является фактором вирулентности, который способен влиять на механизмы клеточной гибели организма-хозяина [137].

Среди белков, секреция которых была ингибирована в штамме с транскрипцией MTS1338, можно выделить:

- Секретирующийся антиген 85-С FbpC – это член комплекса антигенов 85 (Ag85), которые отвечают за аффинность микобактерий к фибронектину и обладают миколитрансферазной активностью [74] *M. smegmatis* имеет 5 миколитрансфераз: FbpA, FbpB, FbpC, и два гомолога FbpD, которые обладают функциональной избыточностью. FbpA и FbpB экспрессируются на низком уровне, как в контрольном, так и в экспрессирующем MTS1338 штаммах, в то время как экспрессия обоих FbpD и FbpC присутствует только в контрольном штамме.
- Порин MspA, является главным порином *M. smegmatis*. Он формирует заполненный водой канал, который способствует проницаемости гидрофильных молекул, таких как катионы, аминокислоты и фосфаты [138]. Поскольку поступление питательных веществ, обеспечиваемых этим порином, является одним из главных факторов, определяющих скорость роста *M. smegmatis* [139], ингибирование его секреции, опосредованное

MTS1338, может объяснять замедление роста штамма, транскрибирующего эту малую РНК (Рис. 47).

Полные списки белков, по которым различаются секреты обоих штаммов приведены в Приложении Ф.

Обнаруженные между штаммами различия в экспрессии белков были подтверждены на транскриптомном уровне с помощью количественной ПЦР нескольких случайно выбранных генов. Проверка была выполнена в экспоненциальной ($OP_{600} = 0,8$) и стационарной ($OP_{600} = 2,0$) фазах роста (Приложение X).

Заключение

Малые некодирующие РНК бактерий представляют собой основной регуляторный элемент, участвующий в различных биологических процессах на посттранскрипционном уровне. В условиях, когда бактерии сталкиваются с разнообразными стрессовыми факторами, способность быстро и гибко реагировать на изменения окружающей среды становится ключевой для их выживания. Именно малые нкРНК, как регуляторы экспрессии генов, играют центральную роль в этом адаптивном ответе, обеспечивая приспособление бактерий к новым условиям.

Одним из наиболее распространенных и принципиальных вызовов, с которыми сталкиваются микроорганизмы во многих экосистемах, является холодовой стресс. Низкие температуры вызывают ряд неблагоприятных изменений на клеточном уровне, включая замедление метаболических процессов, изменение текучести мембраны и изменение стабильности вторичных структур РНК. Для выживания в условиях холодowego стресса бактериям необходимо быстро активировать системы адаптации, которые помогут им восстановить гомеостаз и продолжить нормальное функционирование. В нашей работе было выявлено 43 цис-кодируемых и 13 транс-кодируемых регуляторных РНК *M. smegmatis*, которые могут принимать участие в адаптации к холодовому стрессу; ранее из этого набора было описано всего 5 нкРНК. Мы также провели полнотранскриптомное профилирование *M. smegmatis* в динамике адаптации к низким температурам и описали протекающие процессы. С помощью корреляционного анализа и биоинформатического предсказания были выявлены предполагаемые мРНК-мишени идентифицированных нкРНК и определены потенциальные биологические пути, в которых они могут участвовать. В совокупности, данный этап работы представляет собой первое систематическое исследование адаптации микобактерий к холодовому стрессу на транскриптомном уровне.

Другими распространенными стрессами, с которыми сталкиваются как патогенные, так и непатогенные микобактерии, являются окислительный и кислотный стрессы. Ранее было показано, что одна из самых распространенных известных микобактериальных нкРНК, F6 может принимать участие в адаптации *M. tuberculosis* к этим неблагоприятным условиям [88]. Нами была поставлена задача изучить роль этой регуляторной РНК у *M. smegmatis*, для чего был создан мутант с делецией гена F6, проведено его транскриптомное профилирование методом RNA-seq и изучены фенотипические особенности в ряде *in vitro* экспериментов. Было показано, что F6 действительно принимает участие в адаптации к окислительному стрессу: под негативным контролем этой нкРНК находятся ряд генов, которые обеспечивают повышенное выживание штамма $\Delta F6$ в присутствии H_2O_2 по сравнению со штаммом дикого типа. Также нами было

доказано, что мРНК одного из генов, которые повысили свою экспрессию при делеции F6, *MSMEG_4640*, является прямой мишенью исследуемой регуляторной РНК. Ген *MSMEG_4640* кодирует фактор ресусцитации RpfE2, повышенная экспрессия которого нарушает способность мутантного штамма *M. smegmatis* к переходу в некультивируемое состояние в модели покоя, что необходимо для переживания ряда неблагоприятных условий. Таким образом, F6 представляет собой первый пример микобактериальной нкРНК, функция которой состоит в регуляции перехода в покоящееся состояние.

Малые некодирующие РНК также могут являться факторами вирулентности, играя центральную роль в адаптации к макрофагальным стрессам. MTS1338 представляет собой некодирующую малую РНК, транскрибируемую патогенными микобактериями при инфицировании *in vivo* и *in vitro* в активированных макрофагах. В данной работе была продемонстрирована важная роль MTS1338 в контексте адаптации к различным стрессам. Мы показали, что основным триггером транскрипции MTS1338 *ex vivo* является NO. MTS1338 повышает выживание *M. tuberculosis* в условиях кислотного, нитрозативного и окислительного стрессов, и контролирует экспрессию ряда важных для адаптации транскрипционных факторов. Неожиданным и новым в области исследования некодирующих РНК результатом является то, что гетерологичная транскрипция MTS1338 в непатогенном *M. smegmatis* повышает выживание этой бактерии в условиях инфекции *ex vivo*. Это сопровождается таким же замедлением скорости клеточного деления, как и при гиперэкспрессии MTS1338 в *M. tuberculosis*. Результаты вышеприведенных экспериментов свидетельствуют о том, что гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* приводит к замедлению созревания фаголизосом, модуляции экспрессии ряда цитокинов и появлению потенциальных факторов вирулентности в секретоме и протеоме бактерии. Выявленные эффекты дают основания полагать, что механизм действия MTS1338 не является классическим, и не опирается (или реализуется лишь в некоторых случаях) на конкретные мРНК мишени.

Выводы

1. Выявлено 56 малых некодирующих РНК *M. smegmatis*, предположительно участвующих в адаптации бактерии к низким температурам.
2. Малая некодирующая РНК F6 *M. smegmatis* регулирует транскриптомный ответ микобактерии на окислительный стресс.
3. Транскрипция F6 необходима для перехода *M. smegmatis* в некультивируемое состояние; найдена молекулярная мишень F6 - 5'-нетранслируемая область мРНК гена фактора ресусцитации MSMEG_4640.
4. На животной модели инфекции показано, что малая некодирующая РНК MTS1338 *M. tuberculosis* активно транскрибируется в зараженной легочной ткани *in vivo* на стадии хронической инфекции. Главным индуктором транскрипции MTS1338 является NO, продуцируемый индуцибельной синтазой оксида азота iNOS.
5. MTS1338 участвует в адаптации *M. tuberculosis* к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro*, путем активации экспрессии стресс-специфичных регуляторов транскрипции.
6. Гетерологичная транскрипция РНК MTS1338 в непатогенной бактерии *M. smegmatis* приводит к изменениям в экспрессии ряда транскрипционных факторов, компонентов клеточной стенки и секретирующихся потенциальных факторов вирулентности. Рекомбинантный штамм *M. smegmatis* приобретает ряд свойств *M. tuberculosis* при инфекции в культуре макрофагов.

Список литературы

1. DiChiara, J.M. Multiple small RNAs identified in *Mycobacterium bovis* BCG are also expressed in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* / DiChiara J.M., Contreras-Martinez L.M., Livny J., Smith D., McDonough K.A., Belfort M. // *Nucleic Acids Research* – 2010. – Т. 38 – № 12 – С.4067–4078.
2. Tsai, C.-H. Identification of Novel sRNAs in *Mycobacterial* Species / Tsai C.-H., Baranowski C., Livny J., McDonough K.A., Wade J.T., Contreras L.M. // *PLOS ONE* – 2013. – Т. 8 – № 11 – С.e79411.
3. Chen, Y. Small RNA Profiling in *Mycobacterium* Provides Insights Into Stress Adaptability / Chen Y., Zhai W., Zhang K., Liu H., Zhu T., Su L., Bermudez L., Chen H., Guo A. // *Frontiers in Microbiology* – 2021. – Т. 12.
4. Gerrick, E.R. Small RNA profiling in *Mycobacterium tuberculosis* identifies *MrsI* as necessary for an anticipatory iron sparing response / Gerrick E.R., Barbier T., Chase M.R., Xu R., François J., Lin V.H., Szucs M.J., Rock J.M., Ahmad R., Tjaden B., Livny J., Fortune S.M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2018. – Т. 115 – № 25 – С.6464–6469.
5. Taneja, S. On a stake-out: *Mycobacterial* small RNA identification and regulation / Taneja S., Dutta T. // *Non-coding RNA Research* – 2019. – Т. 4 – № 3 – С.86–95.
6. Coskun, F.S. Small RNAs Asserting Big Roles in *Mycobacteria* / Coskun F.S., Płociński P., Oers N.S.C. van // *Non-Coding RNA* – 2021. – Т. 7 – № 4 – С.69.
7. The top 10 causes of death [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed: 28.06.2023).
8. Pepperell, C.S. Evolution of Tuberculosis Pathogenesis / Pepperell C.S. // *Annual Review of Microbiology* – 2022. – Т. 76 – № 1 – С.661–680.
9. Boutet, E. Small RNAs beyond Model Organisms: Have We Only Scratched the Surface? / Boutet E., Djerroud S., Perreault J. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – Т. 23 – № 8 – С.4448.
10. Felden, B. Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs / Felden B., Cattoir V. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2018. – Т. 62 – № 5 – С.e02503-17.
11. Gottesman, S. Small RNA Regulators and the Bacterial Response to Stress / Gottesman S., McCullen C., Guillier M., Vanderpool C., Majdalani N., Benhammou J., Thompson K., FitzGerald P., Sowa N., FitzGerald D. // *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* – 2006. – Т. 71 – С.1–11.
12. Altuvia, S. Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches / Altuvia S. // *Current Opinion in Microbiology* – 2007. – Т. 10 – № 3 – С.257–261.
13. Croucher, N.J. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq / Croucher N.J., Thomson N.R. // *Current Opinion in Microbiology* – 2010. – Т. 13 – № 5 – С.619–624.
14. Saliba, A.-E. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens / Saliba A.-E., C Santos S., Vogel J. // *Current Opinion in Microbiology* – 2017. – Т. 35 – С.78–87.

15. Sridhar, J. Computational Small RNA Prediction in Bacteria / Sridhar J., Gunasekaran P. // *Bioinformatics and Biology Insights* – 2013. – T. 7 – C.BBI.S11213.
16. Fremin, B.J. Comparative genomics identifies thousands of candidate structured RNAs in human microbiomes / Fremin B.J., Bhatt A.S. // *Genome Biology* – 2021. – T. 22 – № 1 – C.100.
17. Pichon, C. Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria / Pichon C., Felden B. // *Bioinformatics* – 2008. – T. 24 – № 24 – C.2807–2813.
18. Barquist, L. Accelerating Discovery and Functional Analysis of Small RNAs with New Technologies / Barquist L., Vogel J. // *Annual Review of Genetics* – 2015. – T. 49 – C.367–394.
19. Sharma, C.M. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA / Sharma C.M., Vogel J. // *Current Opinion in Microbiology* – 2009. – T. 12 – № 5 – C.536–546.
20. Depardieu, F. Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels / Depardieu F., Bikard D. // *Methods* – 2020. – T. 172 – C.61–75.
21. Vogel, J. Target identification of small noncoding RNAs in bacteria / Vogel J., Wagner E.G.H. // *Current Opinion in Microbiology* – 2007. – T. 10 – № 3 – C.262–270.
22. Mann, B. Control of Virulence by Small RNAs in *Streptococcus pneumoniae* / Mann B., Opijnen T. van, Wang J., Obert C., Wang Y.-D., Carter R., McGoldrick D.J., Ridout G., Camilli A., Tuomanen E.I., Rosch J.W. // *PLOS Pathogens* – 2012. – T. 8 – № 7 – C.e1002788.
23. Morita, T. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs / Morita T., Maki K., Aiba H. // *Genes & Development* – 2005. – T. 19 – № 18 – C.2176–2186.
24. Jazurek, M. Identifying proteins that bind to specific RNAs - focus on simple repeat expansion diseases / Jazurek M., Ciesiolka A., Starega-Roslan J., Bilinska K., Krzyzosiak W.J. // *Nucleic Acids Research* – 2016. – T. 44 – № 19 – C.9050–9070.
25. Hafner, M. CLIP and complementary methods / Hafner M., Katsantoni M., Köster T., Marks J., Mukherjee J., Staiger D., Ule J., Zavolan M. // *Nature Reviews Methods Primers* – 2021. – T. 1 – № 1 – C.1–23.
26. Zambelli, F. RIP-Seq data analysis to determine RNA-protein associations / Zambelli F., Pavesi G. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2015. – T. 1269 – C.293–303.
27. Eichner, H. The emerging role of bacterial regulatory RNAs in disease / Eichner H., Karlsson J., Loh E. // *Trends in Microbiology* – 2022. – T. 30 – № 10 – C.959–972.
28. Gerhart, E. Noncoding RNAs Encoded by Bacterial Chromosomes / Gerhart E., Wagner E.G.H., Vogel Prof. Dr J. – 2003.
29. Saberi, F. Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: a review on function and applications / Saberi F., Kamali M., Najafi A., Yazdanparast A., Moghaddam M.M. // *Cellular & Molecular Biology Letters* – 2016. – T. 21 – № 1 – C.6.
30. Kawano, M. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin / Kawano M., Aravind L., Storz G. // *Molecular Microbiology* – 2007. – T. 64 – № 3 – C.738–754.

31. Watkins, D. Regulatory roles of small RNAs in prokaryotes: parallels and contrast with eukaryotic miRNA / Watkins D., Arya D.P. // *Non-coding RNA Investigation* – 2019. – T. 3 – № 0.
32. Morfeldt, E. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII / Morfeldt E., Taylor D., Gabain A. von, Arvidson S. // *The EMBO journal* – 1995. – T. 14 – № 18 – C.4569–4577.
33. Novick, R.P. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. / Novick R.P., Ross H.F., Projan S.J., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S. // *The EMBO Journal* – 1993. – T. 12 – № 10 – C.3967–3975.
34. Chevalier, C. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation / Chevalier C., Boisset S., Romilly C., Masquida B., Fechter P., Geissmann T., Vandenesch F., Romby P. // *PLoS pathogens* – 2010. – T. 6 – № 3 – C.e1000809.
35. Huntzinger, E. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression / Huntzinger E., Boisset S., Saveanu C., Benito Y., Geissmann T., Namane A., Lina G., Etienne J., Ehresmann B., Ehresmann C., Jacquier A., Vandenesch F., Romby P. // *The EMBO journal* – 2005. – T. 24 – № 4 – C.824–835.
36. Papenfort, K. Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis / Papenfort K., Sun Y., Miyakoshi M., Vanderpool C.K., Vogel J. // *Cell* – 2013. – T. 153 – № 2 – C.426–437.
37. Kawamoto, H. Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq / Kawamoto H., Koide Y., Morita T., Aiba H. // *Molecular Microbiology* – 2006. – T. 61 – № 4 – C.1013–1022.
38. Vanderpool, C.K. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system / Vanderpool C.K., Gottesman S. // *Molecular Microbiology* – 2004. – T. 54 – № 4 – C.1076–1089.
39. Wadler, C.S. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide / Wadler C.S., Vanderpool C.K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2007. – T. 104 – № 51 – C.20454–20459.
40. Giangrossi, M. A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri* / Giangrossi M., Prosseda G., Tran C.N., Brandi A., Colonna B., Falconi M. // *Nucleic Acids Research* – 2010. – T. 38 – № 10 – C.3362–3375.
41. Udekwu, K.I. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA / Udekwu K.I., Darfeuille F., Vogel J., Reimegård J., Holmqvist E., Wagner E.G.H. // *Genes & Development* – 2005. – T. 19 – № 19 – C.2355–2366.
42. Leiva, L.E. Regulation of Leaderless mRNA Translation in Bacteria / Leiva L.E., Katz A. // *Microorganisms* – 2022. – T. 10 – № 4 – C.723.
43. Sharma, C.M. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites / Sharma C.M., Darfeuille F., Plantinga T.H., Vogel J. // *Genes & Development* – 2007. – T. 21 – № 21 – C.2804–2817.

44. Pfeiffer, V. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation / Pfeiffer V., Papenfort K., Lucchini S., Hinton J.C.D., Vogel J. // *Nature Structural & Molecular Biology* – 2009. – T. 16 – № 8 – C.840–846.
45. Bandyra, K.J. The seed region of a small RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by the endoribonuclease RNase E / Bandyra K.J., Said N., Pfeiffer V., Górna M.W., Vogel J., Luisi B.F. // *Molecular Cell* – 2012. – T. 47 – № 6 – C.943–953.
46. Vecerek, B. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding / Vecerek B., Moll I., Bläsi U. // *The EMBO journal* – 2007. – T. 26 – № 4 – C.965–975.
47. Sonnleitner, E. The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal / Sonnleitner E., Gonzalez N., Sorger-Domenigg T., Heeb S., Richter A.S., Backofen R., Williams P., Hüttenhofer A., Haas D., Bläsi U. // *Molecular Microbiology* – 2011. – T. 80 – № 4 – C.868–885.
48. Prévost, K. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage / Prévost K., Desnoyers G., Jacques J.-F., Lavoie F., Massé E. // *Genes & Development* – 2011. – T. 25 – № 4 – C.385–396.
49. Brownlee, G.G. Sequence of 6S RNA of *E. coli* / Brownlee G.G. // *Nature New Biology* – 1971. – T. 229 – № 5 – C.147–149.
50. Wassarman, K.M. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity / Wassarman K.M., Storz G. // *Cell* – 2000. – T. 101 – № 6 – C.613–623.
51. Li, Z. 6S-1 RNA Contributes to Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis* / Li Z., Zhu L., Yu Z., Liu L., Chou S.-H., Wang J., He J. // *Frontiers in Microbiology* – 2020. – T. 11 – C.604458.
52. Wassarman, K.M. Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase / Wassarman K.M., Saecker R.M. // *Science (New York, N.Y.)* – 2006. – T. 314 – № 5805 – C.1601–1603.
53. Beckmann, B.M. A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis* / Beckmann B.M., Hoch P.G., Marz M., Willkomm D.K., Salas M., Hartmann R.K. // *The EMBO Journal* – 2012. – T. 31 – № 7 – C.1727–1738.
54. Cavanagh, A.T. 6S RNA, a Global Regulator of Transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Beyond / Cavanagh A.T., Wassarman K.M. // *Annual Review of Microbiology* – 2014. – T. 68 – № 1 – C.45–60.
55. Liu, M.Y. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli* / Liu M.Y., Gui G., Wei B., Preston J.F., Oakford L., Yüksel U., Giedroc D.P., Romeo T. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1997. – T. 272 – № 28 – C.17502–17510.
56. Baker, C.S. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in *Escherichia coli* / Baker C.S., Morozov I., Suzuki K., Romeo T., Babitzke P. // *Molecular Microbiology* – 2002. – T. 44 – № 6 – C.1599–1610.
57. Suzuki, K. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli* / Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Pernestig A.-K., Melefors O., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. // *Journal of Bacteriology* – 2002. – T. 184 – № 18 – C.5130–5140.

58. Lalaouna, D. GcvB small RNA uses two distinct seed regions to regulate an extensive targetome / Lalaouna D., Eyraud A., Devinck A., Prévost K., Massé E. // *Molecular Microbiology* – 2019. – T. 111 – № 2 – C.473–486.
59. Miyakoshi, M. Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA / Miyakoshi M., Chao Y., Vogel J. // *The EMBO journal* – 2015. – T. 34 – № 11 – C.1478–1492.
60. Figueroa-Bossi, N. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target / Figueroa-Bossi N., Valentini M., Malleret L., Fiorini F., Bossi L. // *Genes & Development* – 2009. – T. 23 – № 17 – C.2004–2015.
61. Bassetti, M. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections / Bassetti M., Vena A., Croxatto A., Righi E., Guery B. // *Drugs in Context* – 2018. – T. 7 – C.212527.
62. Koeppen, K. A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles / Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W., Demers E.G., Dolben E.L., Hammond J.H., Hogan D.A., Stanton B.A. // *PLoS Pathogens* – 2016. – T. 12 – № 6 – C.e1005672.
63. Habier, J. Extraction and Analysis of RNA Isolated from Pure Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles / Habier J., May P., Heintz-Buschart A., Ghosal A., Wienecke-Baldacchino A.K., Nolte-t Hoen E.N.M., Wilmes P., Fritz J.V. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2018. – T. 1737 – C.213–230.
64. Pagliuso, A. An RNA-Binding Protein Secreted by a Bacterial Pathogen Modulates RIG-I Signaling / Pagliuso A., Tham T.N., Allemand E., Robertin S., Dupuy B., Bertrand Q., Bécavin C., Koutero M., Najburg V., Nahori M.-A., Tangy F., Stavru F., Bessonov S., Dessen A., Muchardt C., Lebreton A., Komarova A.V., Cossart P. // *Cell Host & Microbe* – 2019. – T. 26 – № 6 – C.823- 835.e11.
65. Gu, H. Salmonella produce microRNA-like RNA fragment Sal-1 in the infected cells to facilitate intracellular survival / Gu H., Zhao C., Zhang T., Liang H., Wang X.-M., Pan Y., Chen X., Zhao Q., Li D., Liu F., Zhang C.-Y., Zen K. // *Scientific Reports* – 2017. – T. 7 – № 1 – C.2392.
66. Ruby, E.G. The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Light Organ Association: Current Ecological Paradigms / Ruby E.G., Lee K.-H. // *Applied and Environmental Microbiology* – 1998. – T. 64 – № 3 – C.805–812.
67. Moriano-Gutierrez, S. The noncoding small RNA SsrA is released by *Vibrio fischeri* and modulates critical host responses / Moriano-Gutierrez S., Bongrand C., Essock-Burns T., Wu L., McFall-Ngai M.J., Ruby E.G. // *PLoS biology* – 2020. – T. 18 – № 11 – C.e3000934.
68. Luna-Acosta, A. Recent findings on phenoloxidases in bivalves / Luna-Acosta A., Breitwieser M., Renault T., Thomas-Guyon H. // *Marine Pollution Bulletin* – 2017. – T. 122 – № 1–2 – C.5–16.
69. Engebrecht, J. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri* / Engebrecht J., Nealson K., Silverman M. // *Cell* – 1983. – T. 32 – № 3 – C.773–781.
70. Vogel, J. Hfq and its constellation of RNA / Vogel J., Luisi B.F. // *Nature Reviews. Microbiology* – 2011. – T. 9 – № 8 – C.578–589.
71. Updegrove, T.B. Hfq: the flexible RNA matchmaker / Updegrove T.B., Zhang A., Storz G. // *Current Opinion in Microbiology* – 2016. – T. 30 – C.133–138.

72. Santiago-Frangos, A. Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA / Santiago-Frangos A., Woodson S.A. // Wiley interdisciplinary reviews. RNA – 2018. – T. 9 – № 4 – C.e1475.
73. Kreth, J. Regulatory RNAs☆ / под ред. Т.М. Schmidt. Oxford: Academic Press, 2019. – 62–84c.
74. Santiago-Frangos, A. C-terminal domain of the RNA chaperone Hfq drives sRNA competition and release of target RNA / Santiago-Frangos A., Kavita K., Schu D.J., Gottesman S., Woodson S.A. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2016. – T. 113 – № 41 – C.E6089–E6096.
75. Smirnov, A. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein / Smirnov A., Förstner K.U., Holmqvist E., Otto A., Günster R., Becher D., Reinhardt R., Vogel J. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2016. – T. 113 – № 41 – C.11591–11596.
76. Melamed, S. RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles / Melamed S., Adams P.P., Zhang A., Zhang H., Storz G. // Molecular Cell – 2020. – T. 77 – № 2 – C.411- 425.e7.
77. Holmqvist, E. Global Maps of ProQ Binding In Vivo Reveal Target Recognition via RNA Structure and Stability Control at mRNA 3' Ends / Holmqvist E., Li L., Bischler T., Barquist L., Vogel J. // Molecular Cell – 2018. – T. 70 – № 5 – C.971- 982.e6.
78. Bohn, C. Experimental discovery of small RNAs in Staphylococcus aureus reveals a riboregulator of central metabolism / Bohn C., Rigoulay C., Chabelskaya S., Sharma C.M., Marchais A., Skorski P., Borezée-Durant E., Barbet R., Jacquet E., Jacq A., Gautheret D., Felden B., Vogel J., Bouloc P. // Nucleic Acids Research – 2010. – T. 38 – № 19 – C.6620–6636.
79. Rochat, T. Tracking the Elusive Function of Bacillus subtilis Hfq / Rochat T., Delumeau O., Figueroa-Bossi N., Noirot P., Bossi L., Dervyn E., Bouloc P. // PloS One – 2015. – T. 10 – № 4 – C.e0124977.
80. Rochat, T. Lack of interchangeability of Hfq-like proteins / Rochat T., Bouloc P., Yang Q., Bossi L., Figueroa-Bossi N. // Biochimie – 2012. – T. 94 – № 7 – C.1554–1559.
81. Jouselin, A. On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq / Jouselin A., Metzinger L., Felden B. // Trends in Microbiology – 2009. – T. 17 – № 9 – C.399–405.
82. Bae, W. CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli, negatively regulates its own gene expression / Bae W., Jones P.G., Inouye M. // Journal of Bacteriology – 1997. – T. 179 – № 22 – C.7081–7088.
83. Caballero, C.J. The regulon of the RNA chaperone CspA and its auto-regulation in Staphylococcus aureus / Caballero C.J., Menendez-Gil P., Catalan-Moreno A., Vergara-Irigaray M., García B., Segura V., Irurzun N., Villanueva M., Ruiz de los Mozos I., Solano C., Lasa I., Toledo-Arana A. // Nucleic Acids Research – 2018. – T. 46 – № 3 – C.1345–1361.
84. Schwenk, S. Regulatory RNA in Mycobacterium tuberculosis, back to basics / Schwenk S., Arnvig K.B. // Pathogens and Disease – 2018. – T. 76 – № 4 – C.fty035.
85. Płociński, P. Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of Mycobacterium tuberculosis / Płociński P.,

Macios M., Houghton J., Niemiec E., Płocińska R., Brzostek A., Słomka M., Dziadek J., Young D., Dziembowski A. // *Nucleic Acids Research* – 2019. – T. 47 – № 11 – C.5892–5905.

86. Mai, J. Mycobacterium tuberculosis 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones / Mai J., Rao C., Watt J., Sun X., Lin C., Zhang L., Liu J. // *Nucleic Acids Research* – 2019. – T. 47 – № 8 – C.4292–4307.

87. Vincent Lévy-Frédault, V. Proposed Minimal Standards for the Genus Mycobacterium and for Description of New Slowly Growing Mycobacterium Species† / Vincent Lévy-Frédault V., Portaels F. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* – 1992. – T. 42 – № 2 – C.315–323.

88. Arnvig, K.B. Identification of small RNAs in Mycobacterium tuberculosis / Arnvig K.B., Young D.B. // *Molecular Microbiology* – 2009. – T. 73 – № 3 – C.397–408.

89. Akama, T. Whole-Genome Tiling Array Analysis of Mycobacterium leprae RNA Reveals High Expression of Pseudogenes and Noncoding Regions / Akama T., Suzuki K., Tanigawa K., Kawashima A., Wu H., Nakata N., Osana Y., Sakakibara Y., Ishii N. // *Journal of Bacteriology* – 2009. – T. 191 – № 10 – C.3321–3327.

90. Arnvig, K.B. Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of Mycobacterium tuberculosis / Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T.T., Parkhill J., Dougan G., Young D.B. // *PLoS pathogens* – 2011. – T. 7 – № 11 – C.e1002342.

91. Miotto, P. Genome-Wide Discovery of Small RNAs in Mycobacterium tuberculosis / Miotto P., Forti F., Ambrosi A., Pellin D., Veiga D.F., Balazsi G., Gennaro M.L., Serio C.D., Ghisotti D., Cirillo D.M. // *PLOS ONE* – 2012. – T. 7 – № 12 – C.e51950.

92. Pellin, D. A Genome-Wide Identification Analysis of Small Regulatory RNAs in Mycobacterium tuberculosis by RNA-Seq and Conservation Analysis / Pellin D., Miotto P., Ambrosi A., Cirillo D.M., Serio C.D. // *PLOS ONE* – 2012. – T. 7 – № 3 – C.e32723.

93. Livny, J. High-Throughput, Kingdom-Wide Prediction and Annotation of Bacterial Non-Coding RNAs / Livny J., Teonadi H., Livny M., Waldor M.K. // *PLOS ONE* – 2008. – T. 3 – № 9 – C.e3197.

94. Ignatov, D. RNA-Seq Analysis of Mycobacterium avium Non-Coding Transcriptome / Ignatov D., Malakho S., Majorov K., Skvortsov T., Apt A., Azhikina T. // *PLOS ONE* – 2013. – T. 8 – № 9 – C.e74209.

95. Li, S.-K. Identification of small RNAs in Mycobacterium smegmatis using heterologous Hfq / Li S.-K., Ng P.K.-S., Qin H., Lau J.K.-Y., Lau J.P.-Y., Tsui S.K.-W., Chan T.-F., Lau T.C.-K. // *RNA (New York, N.Y.)* – 2013. – T. 19 – № 1 – C.74–84.

96. Ozuna, A. baerhunter: an R package for the discovery and analysis of expressed non-coding regions in bacterial RNA-seq data / Ozuna A., Liberto D., Joyce R.M., Arnvig K.B., Nobeli I. // *Bioinformatics* – 2020. – T. 36 – № 3 – C.966–969.

97. Solans, L. The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in Mycobacterium tuberculosis / Solans L., Gonzalo-Asensio J., Sala C., Benjak A., Uplekar S., Rougemont J., Guilhot C., Malaga W., Martín C., Cole S.T. // *PLOS Pathogens* – 2014. – T. 10 – № 5 – C.e1004183.

98. Walters, S.B. The Mycobacterium tuberculosis PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis / Walters S.B., Dubnau E., Kolesnikova I., Laval F., Daffe M., Smith I. // *Molecular Microbiology* – 2006. – T. 60 – № 2 – C.312–330.
99. Kuo, C.-J. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin / Kuo C.-J., Bell H., Hsieh C.-L., Ptak C.P., Chang Y.-F. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2012. – T. 287 – № 3 – C.1892–1902.
100. Naito, M. The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria / Naito M., Ohara N., Matsumoto S., Yamada T. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1998. – T. 273 – № 5 – C.2905–2909.
101. Weinberg, Z. Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline / Weinberg Z., Barrick J.E., Yao Z., Roth A., Kim J.N., Gore J., Wang J.X., Lee E.R., Block K.F., Sudarsan N., Neph S., Tompa M., Ruzzo W.L., Breaker R.R. // *Nucleic Acids Research* – 2007. – T. 35 – № 14 – C.4809–4819.
102. Bar-Oz, M. The small non-coding RNA B11 regulates multiple facets of Mycobacterium abscessus virulence / Bar-Oz M., Martini M.C., Alonso M.N., Meir M., Lore N.I., Miotto P., Riva C., Angala S.K., Xiao J., Masiello C.S., Misiakou M.-A., Sun H., Moy J.K., Jackson M., Johansen H.K., Cirillo D.M., Shell S.S., Barkan D. // *PLOS Pathogens* – 2023. – T. 19 – № 8 – C.e1011575.
103. Rodriguez, G.M. The Iron Response of Mycobacterium tuberculosis and Its Implications for Tuberculosis Pathogenesis and Novel Therapeutics / Rodriguez G.M., Sharma N., Biswas A., Sharma N. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* – 2022. – T. 12 – C.876667.
104. Ignatov, D.V. Expression of small RNAs of Mycobacterium tuberculosis in murine models of tuberculosis infection / Ignatov D.V., Timoshina O.Yu., Logunova N.N., Skvortsov T.A., Azhikina T.L. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* – 2014. – T. 40 – № 2 – C.233–235.
105. Hnilicová, J. Ms1, a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria / Hnilicová J., Jirátková J., Šíková M., Pospíšil J., Halada P., Pánek J., Krásný L. // *Nucleic Acids Research* – 2014. – T. 42 – № 18 – C.11763–11776.
106. Šíková, M. Ms1 RNA increases the amount of RNA polymerase in Mycobacterium smegmatis / Šíková M., Janoušková M., Ramaniuk O., Páleníková P., Pospíšil J., Bartl P., Suder A., Pajer P., Kubičková P., Pavliš O., Hradilová M., Vítovská D., Šanderová H., Převorovský M., Hnilicová J., Krásný L. // *Molecular Microbiology* – 2019. – T. 111 – № 2 – C.354–372.
107. Olatz Ruiz-Larrabeiti, NAD⁺ capping of RNA in Archaea and Mycobacteria - Abstract - Europe PMC [Электронный ресурс]. URL: <https://europepmc.org/article/ppr/ppr433163> (accessed: 28.06.2023).
108. Petrov, A. Chapter Sixteen - Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory Methods in Enzymology: RNA // под ред. J. Lorsch. Academic Press, 2013. – 301–313c.
109. Parish, T. Electroporation of mycobacteria / Parish T., Stoker N.G. // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) – 1995. – T. 47 – C.237–252.
110. Parish, T. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement / Parish T., Stoker N.G. // *Microbiology* (Reading, England) – 2000. – T. 146 (Pt 8) – C.1969–1975.

111. Shleeva, M. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation / Shleeva M., Mukamolova G.V., Young M., Williams H.D., Kaprelyants A.S. // *Microbiology* – 2004. – T. 150 – № 6 – C.1687–1697.
112. Man, J.C. de The probability of most probable numbers / Man J.C. de // *European journal of applied microbiology and biotechnology* – 1975. – T. 1 – № 1 – C.67–78.
113. Shleeva, M.O. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification / Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // *Tuberculosis* – 2011. – T. 91 – № 2 – C.146–154.
114. Huang, Y. Scalable and cost-effective ribonuclease-based rRNA depletion for transcriptomics / Huang Y., Sheth R.U., Kaufman A., Wang H.H. // *Nucleic Acids Research* – 2020. – T. 48 – № 4 – C.e20.
115. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / Langmead B., Salzberg S.L. // *Nature Methods* – 2012. – T. 9 – № 4 – C.357–359.
116. Liao, Y. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features / Liao Y., Smyth G.K., Shi W. // *Bioinformatics* – 2014. – T. 30 – № 7 – C.923–930.
117. Kapopoulou, A. The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes / Kapopoulou A., Lew J.M., Cole S.T. // *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* – 2011. – T. 91 – № 1 – C.8–13.
118. Love, M.I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biology* – 2014. – T. 15 – № 12 – C.550.
119. Robinson, M.D. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data / Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. // *Bioinformatics (Oxford, England)* – 2010. – T. 26 – № 1 – C.139–140.
120. Sherman, B.T. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) / Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. // *Nucleic Acids Research* – 2022. – T. 50 – № W1 – C.W216–W221.
121. Wu, M. TCseq: Time course sequencing data analysis. R package version 1.23.0 [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/MengjunWu/TCseq>.
122. McClure, R. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data / McClure R., Balasubramanian D., Sun Y., Bobrovskyy M., Sumbly P., Genco C.A., Vanderpool C.K., Tjaden B. // *Nucleic Acids Research* – 2013. – T. 41 – № 14 – C.e140.
123. Lamichhane, G. Definition and annotation of (myco)bacterial non-coding RNA / Lamichhane G., Arnvig K.B., McDonough K.A. // *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* – 2013. – T. 93 – № 1 – C.26–29.
124. Perez-Riverol, Y. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data / Perez-Riverol Y., Csordas A., Bai J., Bernal-Llinares M., Hewapathirana S., Kundu D.J., Inuganti A., Griss J., Mayer G., Eisenacher M., Pérez E., Uszkoreit J., Pfeuffer J., Sachsenberg T., Yilmaz Ş., Tiwary S., Cox J., Audain E., Walzer M., Jarnuczak A.F., Ternent T., Brazma A., Vizcaíno J.A. // *Nucleic Acids Research* – 2019. – T. 47 – № D1 – C.D442–D450.

125. Wright, P.R. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains / Wright P.R., Georg J., Mann M., Sorescu D.A., Richter A.S., Lott S., Kleinkauf R., Hess W.R., Backofen R. // *Nucleic Acids Research* – 2014. – Т. 42 – № W1 – С.W119–W123.
126. btjaden TargetRNA3 [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/btjaden/TargetRNA3> (accessed: 11.09.2023).
127. Robinson, J.T. Integrative genomics viewer / Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. // *Nature Biotechnology* – 2011. – Т. 29 – № 1 – С.24–26.
128. Ramírez, F. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis / Ramírez F., Ryan D.P., Grüning B., Bhardwaj V., Kilpert F., Richter A.S., Heyne S., Dündar F., Manke T. // *Nucleic Acids Research* – 2016. – Т. 44 – № W1 – С.W160-165.
129. Blighe, K. EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.18.0 [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.
130. Gruber, A.R. The ViennaRNA web services / Gruber A.R., Bernhart S.H., Lorenz R. // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) – 2015. – Т. 1269 – С.307–326.
131. Darty, K. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure / Darty K., Denise A., Ponty Y. // *Bioinformatics* – 2009. – Т. 25 – № 15 – С.1974–1975.
132. Shires, K. The cold-shock stress response in *Mycobacterium smegmatis* induces the expression of a histone-like protein / Shires K., Steyn L. // *Molecular Microbiology* – 2001. – Т. 39 – № 4 – С.994–1009.
133. Pánek, J. The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures / Pánek J., Krásný L., Bobek J., Ježková E., Korelusová J., Vohradský J. // *Nucleic Acids Research* – 2011. – Т. 39 – № 8 – С.3418–3426.
134. Georg, J. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria / Georg J., Hess W.R. // *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* – 2011. – Т. 75 – № 2 – С.286–300.
135. Ko, E.-M. Negative regulation of the *acsA1* gene encoding the major acetyl-CoA synthetase by cAMP receptor protein in *Mycobacterium smegmatis* / Ko E.-M., Oh Y., Oh J.-I. // *Journal of Microbiology* – 2022. – Т. 60 – № 12 – С.1139–1152.
136. Ouellet, H. The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system / Ouellet H., Johnston J.B., Ortiz de Montellano P.R. // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2010. – Т. 493 – № 1 – С.82–95.
137. Singh, A.K. Characterization of *Mycobacterium smegmatis* sigF mutant and its regulon: overexpression of SigF antagonist (MSMEG_1803) in *M. smegmatis* mimics sigF mutant phenotype, loss of pigmentation, and sensitivity to oxidative stress / Singh A.K., Dutta D., Singh V., Srivastava V., Biswas R.K., Singh B.N. // *MicrobiologyOpen* – 2015. – Т. 4 – № 6 – С.896–916.
138. Farrell, J. Temperature Effects on Microorganisms / Farrell J., Rose A. // *Annual Review of Microbiology* – 1967. – Т. 21 – № 1 – С.101–120.
139. Ingram, M. Psychophilic and psychrotrophic microorganisms / Ingram M. // *Annales De l'Institut Pasteur De Lille* – 1965. – Т. 16 – С.111–118.

140. Sharma, P. RNA thermometers in bacteria: Role in thermoregulation / Sharma P., Mondal K., Kumar S., Tamang S., Najar I.N., Das S., Thakur N. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* – 2022. – T. 1865 – № 7 – C.194871.
141. Giuliadori, A.M. The *cspA* mRNA Is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein *CspA* / Giuliadori A.M., Di Pietro F., Marzi S., Masquida B., Wagner R., Romby P., Gualerzi C.O., Pon C.L. // *Molecular Cell* – 2010. – T. 37 – № 1 – C.21–33.
142. Majdalani, N. DsrA RNA regulates translation of *RpoS* message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription / Majdalani N., Cuning C., Sledjeski D., Elliott T., Gottesman S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1998. – T. 95 – № 21 – C.12462–12467.
143. Sledjeski, D. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. / Sledjeski D., Gottesman S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1995. – T. 92 – № 6 – C.2003–2007.
144. Gierga, G. Non-coding RNAs in marine *Synechococcus* and their regulation under environmentally relevant stress conditions / Gierga G., Voss B., Hess W.R. // *The ISME Journal* – 2012. – T. 6 – № 8 – C.1544–1557.
145. Houghton, J. The *Mycobacterium tuberculosis* sRNA F6 Modifies Expression of Essential Chaperonins, GroEL2 and GroES / Houghton J., Rodgers A., Rose G., D'Halluin A., Kipkorir T., Barker D., Waddell S.J., Arnvig K.B. // *Microbiology Spectrum* – 2021. – T. 9 – № 2 – C.e0109521.
146. Ghisla, S. Mechanism of inactivation of the flavoenzyme lactate oxidase by oxalate / Ghisla S., Massey V. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1975. – T. 250 – № 2 – C.577–584.
147. Sasseti, C.M. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis / Sasseti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J. // *Molecular Microbiology* – 2003. – T. 48 – № 1 – C.77–84.
148. Daugherty, A. *Mycobacterium smegmatis* RoxY Is a Repressor of *oxyS* and Contributes to Resistance to Oxidative Stress and Bactericidal Ubiquitin-Derived Peptides ▽ / Daugherty A., Powers K.M., Standley M.S., Kim C.S., Purdy G.E. // *Journal of Bacteriology* – 2011. – T. 193 – № 24 – C.6824–6833.
149. Haverkorn van Rijsewijk, B.R.B. Distinct transcriptional regulation of the two *Escherichia coli* transhydrogenases PntAB and UdhA / Haverkorn van Rijsewijk B.R.B., Kochanowski K., Heinemann M., Sauer U. // *Microbiology (Reading, England)* – 2016. – T. 162 – № 9 – C.1672–1679.
150. Kana, B.D. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro / 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. // *Molecular Microbiology* – 2008. – T. 67 – № 3 – C.672–684.
151. Downing, K.J. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro / Downing K.J., Mischenko V.V., Shleeva M.O., Young D.I., Young M., Kaprelyants A.S., Apt A.S., Mizrahi V. // *Infection and Immunity* – 2005. – T. 73 – № 5 – C.3038–3043.

152. Raman, S. Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence / Raman S., Hazra R., Dascher C.C., Husson R.N. // *Journal of Bacteriology* – 2004. – T. 186 – № 19 – C.6605–6616.
153. Betts, J.C. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling / Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. // *Molecular Microbiology* – 2002. – T. 43 – № 3 – C.717–731.
154. Kinoshita-Daitoku, R. A bacterial small RNA regulates the adaptation of *Helicobacter pylori* to the host environment / Kinoshita-Daitoku R., Kiga K., Miyakoshi M., Otsubo R., Ogura Y., Sanada T., Bo Z., Phuoc T.V., Okano T., Iida T., Yokomori R., Kuroda E., Hirukawa S., Tanaka M., Sood A., Subsomwong P., Ashida H., Binh T.T., Nguyen L.T., Van K.V., Ho D.Q.D., Nakai K., Suzuki T., Yamaoka Y., Hayashi T., Mimuro H. // *Nature Communications* – 2021. – T. 12 – № 1 – C.2085.
155. Ignatov, D.V. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA / Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. // *BMC Genomics* – 2015. – T. 16 – № 1 – C.954.
156. Moores, A. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis* / Moores A., Riesco A.B., Schwenk S., Arnvig K.B. // *PLOS ONE* – 2017. – T. 12 – № 3 – C.e0174079.
157. Apt, A. Man and mouse TB: contradictions and solutions / Apt A., Kramnik I. // *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* – 2009. – T. 89 – № 3 – C.195–198.
158. Linge, I. Prolonged B-Lymphocyte-Mediated Immune and Inflammatory Responses to Tuberculosis Infection in the Lungs of TB-Resistant Mice / Linge I., Kondratieva E., Apt A. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2023. – T. 24 – № 2 – C.1140.
159. Kak, G. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases / Kak G., Raza M., Tiwari B.K. // *Biomolecular Concepts* – 2018. – T. 9 – № 1 – C.64–79.
160. Saunders, B.M. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis / Saunders B.M., Britton W.J. // *Immunology & Cell Biology* – 2007. – T. 85 – № 2 – C.103–111.
161. Boon, C. How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later / Boon C., Dick T. // *Future Microbiology* – 2012. – T. 7 – № 4 – C.513–518.
162. MacMicking, J. Nitric Oxide and Macrophage Function / MacMicking J., Xie Q., Nathan C. // *Annual Review of Immunology* – 1997. – T. 15 – № 1 – C.323–350.
163. Bogdan, C. The role of nitric oxide in innate immunity / Bogdan C., Röllinghoff M., Diefenbach A. // *Immunological Reviews* – 2000. – T. 173 – C.17–26.
164. Hu, Y. Detection of mRNA Transcripts and Active Transcription in Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Induced by Exposure to Rifampin or Pyrazinamide / Hu Y., Mangan J.A., Dhillon J., Sole K.M., Mitchison D.A., Butcher P.D., Coates A.R.M. // *Journal of Bacteriology* – 2000. – T. 182 – № 22 – C.6358–6365.
165. Chauhan, N.K. Structural and Functional Characterization of Rv0792c from *Mycobacterium tuberculosis*: Identifying Small Molecule Inhibitor against HutC Protein / Chauhan N.K., Anand A., Sharma A., Dhiman K., Gosain T.P., Singh P., Singh P., Khan E., Chattopadhyay G., Kumar A., Sharma D., Ashish, Sharma T.K., Singh R. // *Microbiology Spectrum* – 2022. – T. 11 – № 1 – C.e01973-22.

166. He, H. Components of the Rv0081-Rv0088 Locus, Which Encodes a Predicted Formate Hydrogenlyase Complex, Are Coregulated by Rv0081, MprA, and DosR in *Mycobacterium tuberculosis* / He H., Bretl D.J., Penoske R.M., Anderson D.M., Zahrt T.C. // *Journal of Bacteriology* – 2011. – T. 193 – № 19 – C.5105–5118.
167. Recchi, C. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1395 Is a Class III Transcriptional Regulator of the AraC Family Involved in Cytochrome P450 Regulation * / Recchi C., Sclavi B., Rauzier J., Gicquel B., Reytrat J.-M. // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – T. 278 – № 36 – C.33763–33773.
168. Camacho, L.R. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis / Camacho L.R., Ensergueix D., Perez E., Gicquel B., Guilhot C. // *Molecular Microbiology* – 1999. – T. 34 – № 2 – C.257–267.
169. Chauhan, S. CmtR, a cadmium-sensing ArsR–SmtB repressor, cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in *Mycobacterium tuberculosis* / Chauhan S., Kumar A., Singhal A., Tyagi J.S., Krishna Prasad H. // *The FEBS Journal* – 2009. – T. 276 – № 13 – C.3428–3439.
170. Li, X. A novel stress-inducible CmtR-ESX3-Zn²⁺ regulatory pathway essential for survival of *Mycobacterium bovis* under oxidative stress / Li X., Chen L., Liao J., Hui J., Li W., He Z.-G. // *Journal of Biological Chemistry* – 2020. – T. 295 – № 50 – C.17083–17099.
171. Gao, C. Characterization of a Novel ArsR-Like Regulator Encoded by Rv2034 in *Mycobacterium tuberculosis* / Gao C., Yang M., He Z.-G. // *PLOS ONE* – 2012. – T. 7 – № 4 – C.e36255.
172. Gao, C.-H. An ArsR-like transcriptional factor recognizes a conserved sequence motif and positively regulates the expression of *phoP* in mycobacteria / Gao C.-H., Yang M., He Z.-G. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2011. – T. 411 – № 4 – C.726–731.
173. Bajaj, R.A. Crystal structure of the toxin Msmeg_6760, the structural homolog of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2035, a novel type II toxin involved in the hypoxic response / Bajaj R.A., Arbing M.A., Shin A., Cascio D., Miallau L. // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* – 2016. – T. 72 – № 12 – C.863–869.
174. Hotter, G.S. Identification of a cadmium-induced gene in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* / Hotter G.S., Wilson T., Collins D.M. // *FEMS Microbiology Letters* – 2001. – T. 200 – № 2 – C.151–155.
175. Rowland, J.L. Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload / Rowland J.L., Niederweis M. // *Tuberculosis* – 2012. – T. 92 – № 3 – C.202–210.
176. Botella, H. Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages / Botella H., Peyron P., Levillain F., Poincloux R., Poquet Y., Brandli I., Wang C., Tailleux L., Tilleul S., Charrière G.M., Waddell S.J., Foti M., Lugo-Villarino G., Gao Q., Maridonneau-Parini I., Butcher P.D., Castagnoli P.R., Gicquel B., de Chastellier C., Neyrolles O. // *Cell Host & Microbe* – 2011. – T. 10 – № 3 – C.248–259.
177. Phelan, J. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance / Phelan J., Coll F., McNerney R., Ascher D.B., Pires D.E.V., Furnham N., Coeck N., Hill-Cawthorne G.A., Nair M.B., Mallard K., Ramsay A., Campino S., Hibberd M.L., Pain A., Rigouts L., Clark T.G. // *BMC Medicine* – 2016. – T. 14 – № 1 – C.31.

178. Li, Q. Characterization of a putative ArsR transcriptional regulator encoded by Rv2642 from *Mycobacterium tuberculosis* / Li Q., Li C., Xie L., Zhang C., Feng Y., Xie J. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* – 2017. – T. 35 – № 9 – C.2031–2039.
179. Yang, M. Cd(II)-binding transcriptional regulator interacts with isoniazid and regulates drug susceptibility in mycobacteria / Yang M., Jia S.-H., Tao H.-L., Zhu C., Jia W.-Z., Hu L.-H., Gao C.-H. // *The Journal of Biochemistry* – 2021. – T. 169 – № 1 – C.43–53.
180. Juárez, M.D. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes / Juárez M.D., Torres A., Espitia C. // *FEMS microbiology letters* – 2001. – T. 203 – № 1 – C.95–102.
181. Clemmensen, H.S. In Vivo Antigen Expression Regulates CD4 T Cell Differentiation and Vaccine Efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* Infection / Clemmensen H.S., Dube J.-Y., McIntosh F., Rosenkrands I., Jungersen G., Aagaard C., Andersen P., Behr M.A., Mortensen R. // *mBio* – 2021. – T. 12 – № 2 – C.10.1128/mbio.00226-21.
182. Fontan, P.A. Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*: Stress control and virulence / Fontan P.A., Walters S., Smith I. // *Current Science* – 2004. – T. 86 – № 1 – C.122–134.
183. Kondratieva, E. An In Vivo Model of Separate *M. tuberculosis* Phagocytosis by Neutrophils and Macrophages: Gene Expression Profiles in the Parasite and Disease Development in the Mouse Host / Kondratieva E., Majorov K., Grigorov A., Skvortsova Y., Kondratieva T., Rubakova E., Linge I., Azhikina T., Apt A. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – T. 23 – № 6 – C.2961.
184. Fu, Y.L. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages / Fu Y.L., Harrison R.E. // *Frontiers in Immunology* – 2021. – T. 12.
185. Deretic, V. Autophagy, an immunologic magic bullet: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block and how to bypass it / Deretic V. // *Future microbiology* – 2008. – T. 3 – № 5 – C.517–524.
186. Eskelinen, E.-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy / Eskelinen E.-L. // *Molecular Aspects of Medicine* – 2006. – T. 27 – № 5–6 – C.495–502.
187. Boni, F.G. Cytokine storm in tuberculosis and IL-6 involvement / Boni F.G., Hamdi I., Koundi L.M., Shrestha K., Xie J. // *Infection, Genetics and Evolution* – 2022. – T. 97 – C.105166.
188. Domingo-Gonzalez, R. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection / Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S. // *Microbiology spectrum* – 2016. – T. 4 – № 5 – C.10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018–2016.
189. Manganelli, R. Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence / Manganelli R. // *Microbiology Spectrum* – 2014. – T. 2 – № 1 – C.MGM2- 0007–2013.

Приложения

Приложение А

Список использованных в исследовании олигонуклеотидов

Таблица А.1 – Используемые в работе олигонуклеотиды

Название	Последовательность (5'-3')
Создание штаммов <i>M. smegmatis</i> ΔF6, ΔF6::F6 и ΔF6::pMV306	
LHA F6 F	TCTCTCAAGCTTGCCTTTCGCTCGCGGTACTACCT
LHA F6 R	TCTCTCGAATTCACGCCTCCGTTACACGTCCCGAAAA
RHA F6 F	TCTCTCGAATTCGTTTCGGGAGTGGCTTGATCCAAAGA
RHA F6 R	CTCTCTGGATCCCGTGAGGCCGCCGACACCAT
F6-KO-check for	TCGCGGAGAAGAAGAAATCCA
F6-KO-check rev	TGGGGGCGTCACTACTCGT
rrnB 200 xbaI for	TCTAGAGAGGGCGGCGTTTATGTG
rrnB 200 hindIII rev	AAGCTTTAAGTTACGTCCTTGAAACTG
F6 hindIII for	ATAAGCTTCGAGTAGCTCCGTGTTGCC
F6 hindIII rev	ATAAGCTTTAATGGCCCCGTGTTGC
Создание репортерных конструкций для проверки взаимодействия 5' НТО мРНК <i>MSMEG_4640</i> и нкРНК <i>M. smegmatis</i> F6	
UTR4640-for	ACCTCTAGATAGTGATCGCGCGTTG
UTR4640-rev	CCAGGATCCTGCCGTACAAACGTTCC
rrnB 200 xbaI for	TCTAGAGAGGGCGGCGTTTATGTG
pMV306 term xbaI rev	TCTAGAGATCACCGCGGCCATGATG
F6-mut-for	GACTCGACGGCAACACGGG
F6-mut-rev	TGTGGGTCAGACGGCAACACG
UTR4640 mut-for	TGTGAAGGGCCACGATGATGATG
UTR4640 mut-rev	GACTTCCGACACGAGGACCG
pMV306-For	TATGGAAAAACGCCAGCAACGC
pMV306-Rev	ATGCCTGGCAGTCGATCGTA
pAMYC-For	AGCAAGAGATTACGCGCAGAC
pAMYC-Rev	GACAGTCATAAGTGCGGCGA
Создание конструкций с геном нкРНК MTS1338 и контрольных плазмид (pMV261-MTS1338, pMV261rrnB, pMV261-MTS1338-GFP, pMV261rrnB-GFP)	
rrnB 200 xbaI for	TCTAGAGAGGGCGGCGTTTATGTG
rrnB 200 hindIII rev	AAGCTTTAAGTTACGTCCTTGAAACTG
MTS1338 HindIII for	ATAAGCTTGGGGAAACCCGGTGATCT
MTS1338 HindIII rev	ATAAGCTTAACAGGATGAGGATCTGCCC
pMV261 ins F	GATGTACGTGGCGAACTCCG
pMV261 ins R	ATGCCTGGCAGTCGATCGTA
pMV261 term	AACCATGATGGCCGGACAAACAACAG
Деплеция 16S и 23S рРНК	
16S F	/5Phos/ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA
Название	Последовательность (5'-3')
23S F	/5Phos/ YGGTGGATGCCTTGGC
23S R	YRCTTAGATGCTTTCAGCRBTTATC
Нозерн-блоттинг	
NB F6	GTCGGGTTCGGGGGGTCAGACGGCAACACGGAGCTA

NB-5S	GTGGTATCCAACGCAGAGT
Количественный ПЦР	
16S MTB qfor	TACGTAGGGTTCGAGCGTTG
16S MTB qrev	CCCGCACGCTCACAGTTAAG
16S MSM qfor	ATGTCGGTTCCTTGTGGC
16S MSM qrev	CAAGGGTTGCGCTCGTTG
MSMEG 0158 qfor	GGAGCAGAACTGGTCCGTAC
MSMEG 0158 qrev	CTCGAAGATCTTGTCTGACGGG
MSMEG 1972 qfor	GAAACCGAGAACAGCCGTCCG
MSMEG 1972 qrev	TCCGAGAGACAGGCGATGAACC
MSMEG 2909 qfor	TGTTCAACTCGATCTGGGACTGC
MSMEG 2909 qrev	ATCCCGTTCGCACACCGTAC
MSMEG 3722 qfor	CCACGTCCGGATGAGGTTCTGA
MSMEG 3722 qrev	ACCTGGATCTCCGCGATGGT
MSMEG 4793 qfor	GGATGTGAATGCGCTGACATCGT
MSMEG 4793 qrev	CTCGATCAACTGGCCGATCACC
MSMEG 6159 qfor	CTCCGCTGACGTGTTTGTCC
MSMEG 6159 qrev	TGGCCGACCTCGAACTCAAC
MSMEG 0149-qfor	ACACCGAAACCGACACCCC
MSMEG 0149-qrev	TTGGGGCGCAGACTTTCCC
MSMEG 0150-qfor	ATCTCTCTGCTGAACGCCTTGAC
MSMEG 0150-qrev	AACACGATGGCCGGAATGGA
MSMEG 0157-qrev	TTGGTGGTGGCATTGGCAAGAG
MSMEG 0157-qfor	TTGCGCTACATCGGATTCCGG
MSMEG 0162-qfor	GCGCACTTCGGTTACCTGC
MSMEG 0162-qrev	CGGCGTAGATCAGGCTGAACA
MSMEG 4640-qfor	GTCAACTGGGACGCCATC
MSMEG 4640-qrev	ACGTGGACTGCTTGAAGTGC
MTS1338-qfor	GGGGAAACCCGGTGATCTG
MTS1338-qrev	GGTAGGTCAAACCGGGTGTACAT
MSMEG 0965 qfor	AACCGTCTTACCCGTGAGTG
MSMEG 0965 qrev	GGGGTGGTGTAGCTGAAGTT
MSMEG 5872 qfor	ACTACGTGACCAAGCCGTTC
MSMEG 5872 qrev	ATCTTGGGCTTGGACAACAC
MSMEG 3886 qfor	GGAGTCTTCGGCTTCAACAG
MSMEG 3886 qrev	CACAGCTGGTACAGCCACAC
MSMEG 2433 qfor	GCTGGTCAACCAGAACGAGT
MSMEG 2433 qrev	TCTTTCACCAGGCCGTACAT
MSMEG 0615 qfor	ATTCTCGACACCAACGAAG
MSMEG 0615 qrev	GTGAACAGACGCTCCATGTC
MSMEG 5244 qfor	ACATCAAGGGCATGGAAGTTC
MSMEG 5244 qrev	GCGATCTGTTTGTGGTCAG
MSMEG 3935 qfor	AGGATCATTCGTCGCAAGTC
MSMEG 3935 qrev	GGTTTCTCGAACGGACTCAG
mIL1- β -qfor	CAACCAACAAGTGATAATTCTCCATG
mIL1- β -qrev	ATCCACACTCTCCAGCTGCA
mTGF- β -qfor	ACCGCAACAACGCCATCTA
mTGF- β -qrev	GCGTATCAGTGGGGGTCAG
mIL6-qfor	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
mIL6-qrev	TGATGCACTTGCAGAAAACA
mIL10-qfor	TGTCAAATTCATTCATGGCCT
mIL10-qrev	ATCGATTTCTCCCCTGTGAA
mTNF- α -qfor	CTGAACTTCGGGGTGATCG
mTNF- α -qrev	GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
mIL12-qfor	TGTCAATCACGCTACCTCCTC
mIL12-qrev	TCGGGACTGGCTAAGACAC
mIL4-qfor	GTTGTCATCCTGCTCTTCTTTCTC
mIL4-qrev	CACTCTCTGTGGTGTCTTCGT
m actin- β -qfor	GATCAAGATCATTTGCTCCTCCTG
m actin- β -qrev	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC

Приложение Б

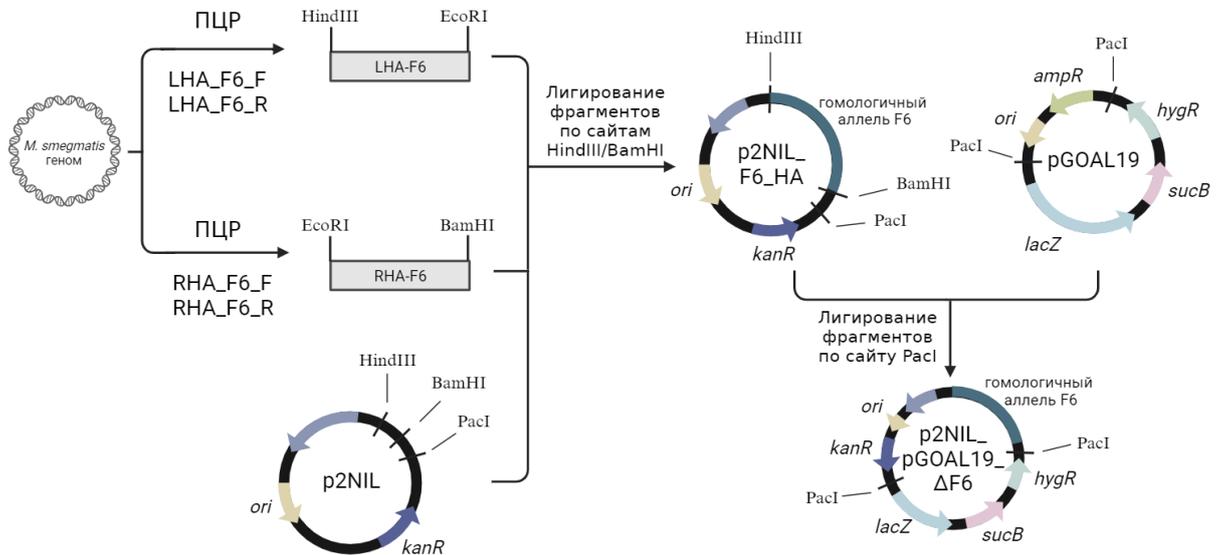
Схема создания конструкции для делеции гена нкРНК F6 *M. smegmatis*

Рисунок Б.1 – Схема создания конструкции p2NIL_pGOAL19_ΔF6 для делеции гена нкРНК F6 *M. smegmatis*

Приложение В

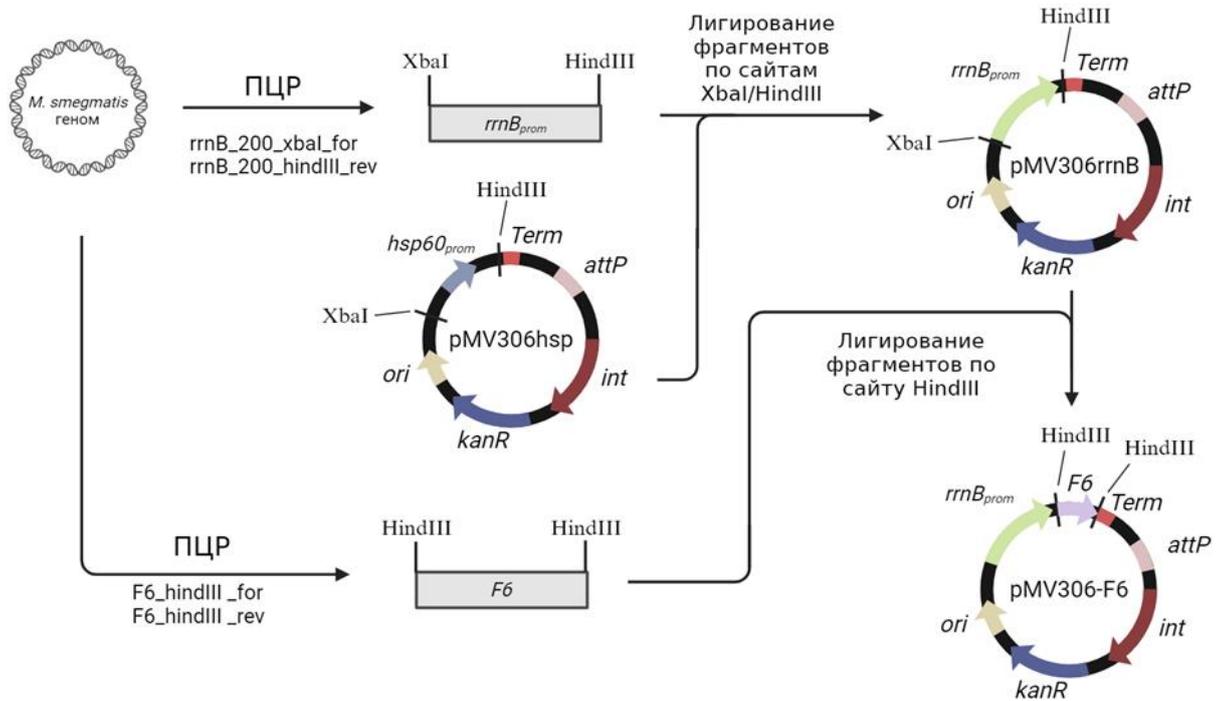
Схема создания конструкции для комплементации штамма $\Delta F6$ *M. smegmatis*

Рисунок В.1 – Схема создания конструкции для комплементации штамма $\Delta F6$ *M. smegmatis* (pMV306-F6) и контрольной конструкции (pMV306rrnB)

Приложение Г

Схема создания репортерной системы для проверки взаимодействия нкРНК F6 и 5'-НТО мРНК *MSMEG_4640*

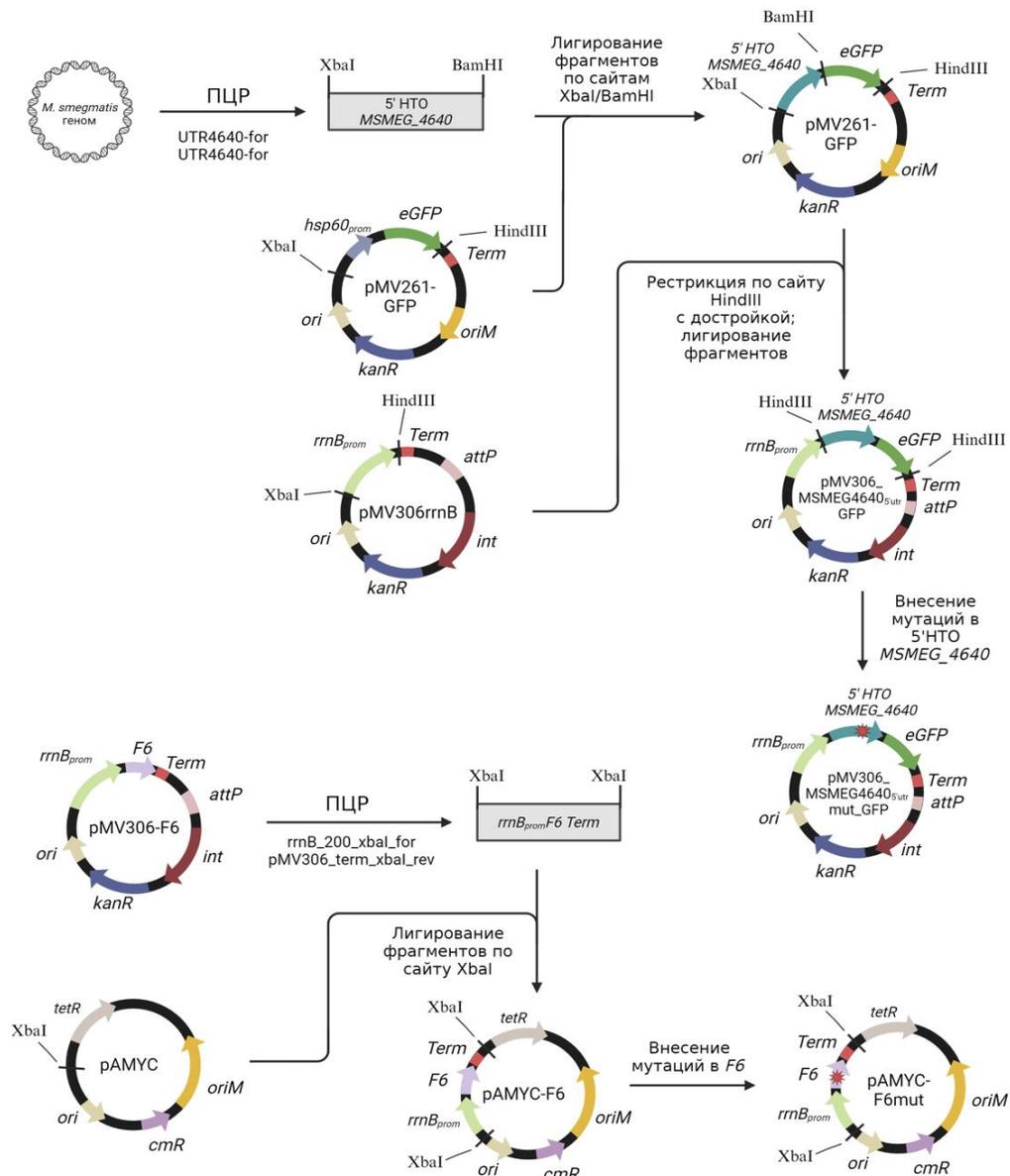


Рисунок Г.1 – Схема создания конструкций репортерной системы для проверки взаимодействия нкРНК F6 и 5'-НТО *MSMEG_4640* (плазмиды pMV306-*MSMEG4640*^{5'utr}-GFP, pMV306-*MSMEG4640*^{5'utr}-mut-GFP, pAMYC-F6, pAMYC-F6mut)

Приложение Д

Схема создания конструкции для транскрипции MTS1338

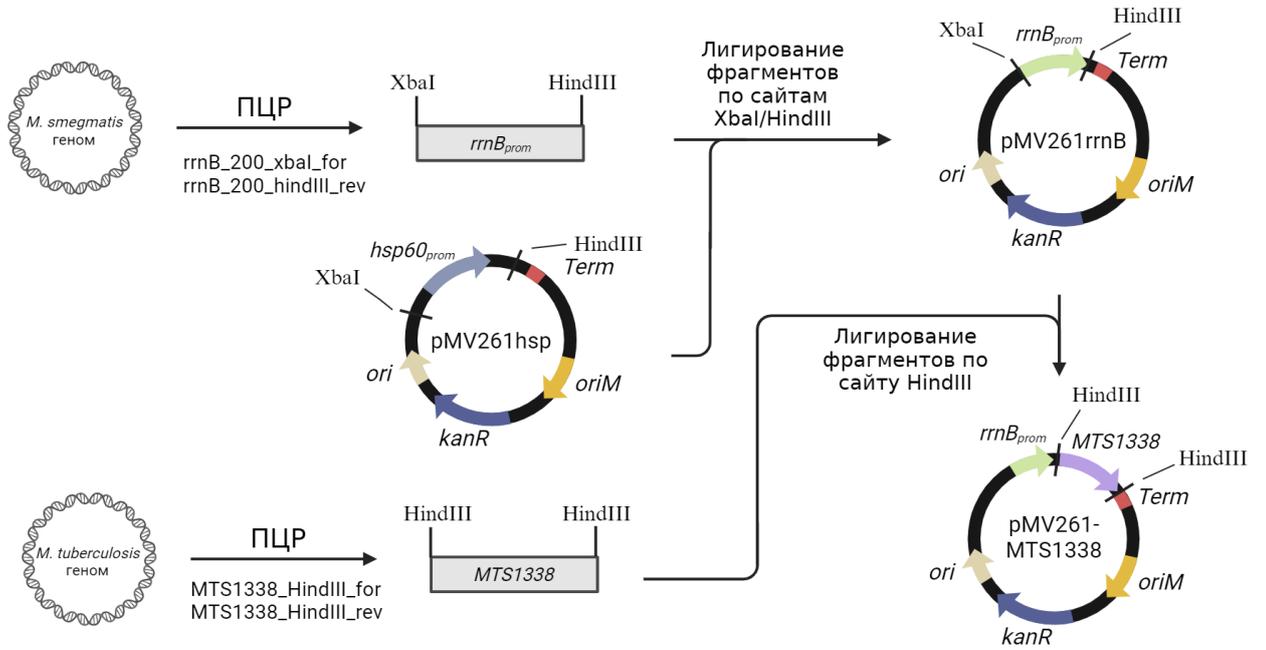


Рисунок Д.1 – Схема создания конструкции для транскрипции MTS1338 (pMV261-MTS1338) и контрольной плазмиды (pMV261rrnB)

Приложение Е

Схема создания конструкции для одновременной транскрипции MTS1338 и экспрессии GFP

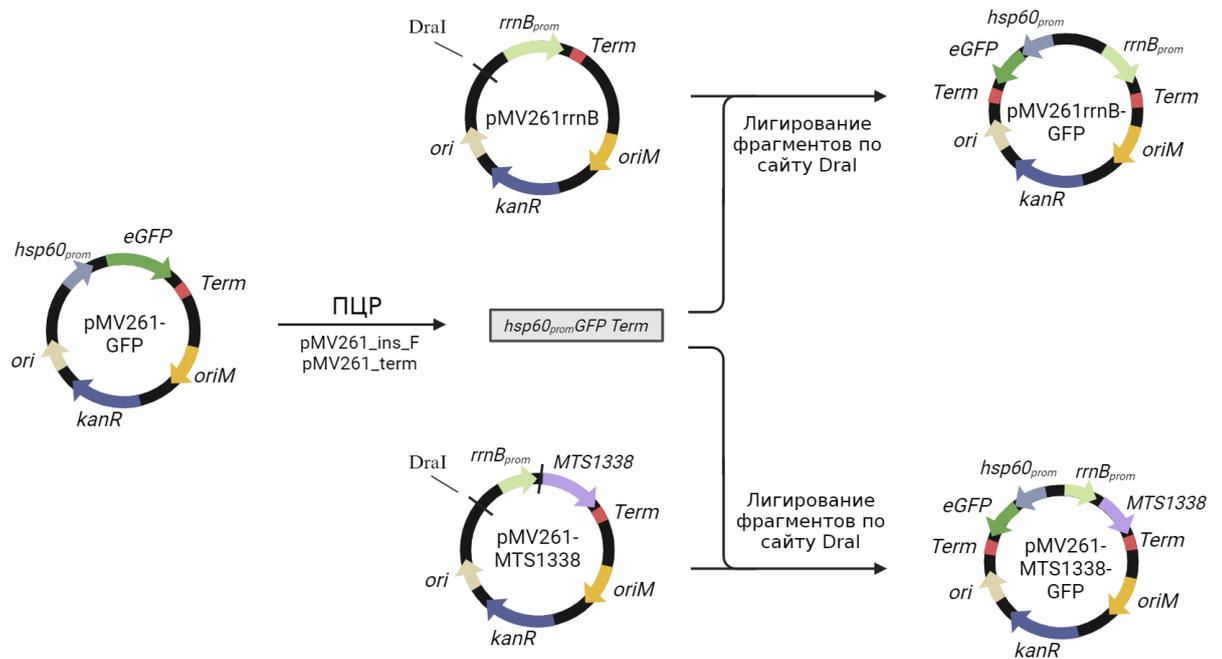


Рисунок Е.1 – Схема создания конструкции для одновременной транскрипции MTS1338 и экспрессии GFP (pMV261-MTS1338-GFP), и контрольного к данной конструкции вектора (pMV261rrnB-GFP)

Приложение Ж

Подтверждение выявленных дифференциально экспрессированных генов *M. smegmatis* в условиях холодного стресса

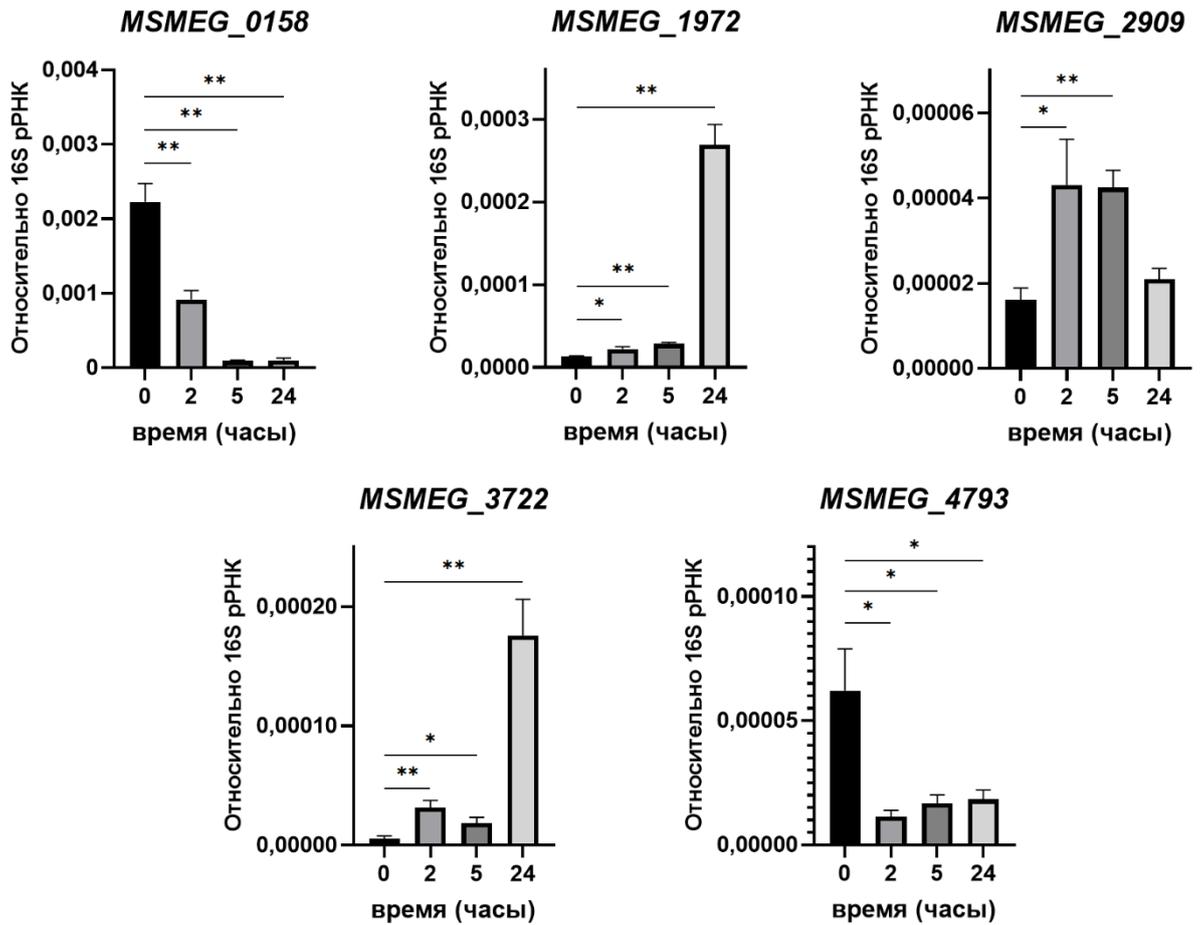


Рисунок Ж.1 – Подтверждение выявленных дифференциально экспрессированных генов *M. smegmatis* в условиях холодного стресса с помощью количественной ОТ-ПЦР; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Приложение И

Список идентифицированных некодирующих РНК *M. smegmatis*Таблица И.1 – Выявленные в условиях холодового стресса некодирующие РНК *M. smegmatis*

Название	Название в литературе	Первое упоминание	Тип	Старт транскрипции	Стоп транскрипции	Длина	Цепь ДНК
ncMSMEG10069c	–	–	межгенная	92444	92318	127	-
ncMSMEG10373B	IGR-2	Li et al., 2013 [13]	межгенная	417812	417967	156	+
ncMSMEG11192	IGR-3	Li et al., 2013 [13]	межгенная	1259277	1259422	146	+
ncMSMEG11248	–	–	межгенная	1324936	1325087	152	+
ncMSMEG11952	–	–	межгенная	2031348	2031593	246	+
ncMSMEG13168	–	–	межгенная	3243077	3243195	119	+
ncMSMEG13916	–	–	межгенная	3985421	3985466	46	+
ncMSMEG14614	–	–	межгенная	4699121	4699269	149	+
ncMSMEG14726	–	–	межгенная	4818706	4818880	175	+
ncMSMEG15366c	–	–	межгенная	5446025	5445854	172	-
ncMSMEG15379	–	–	межгенная	5458677	5458764	88	+
ncMSMEG15794c	IGR-5	Li et al., 2013 [13]	межгенная	5862653	5862475	179	-
ncMSMEG16173	Ms1	Pánek et al., 2011 [15]	межгенная	6242371	6242646	276	+
ncMSMEG0097c	–	–	антисенс	121438	121297	142	-
ncMSMEG0169	–	–	антисенс	194972	195164	193	+
ncMSMEG0222c	–	–	антисенс	248490	248427	64	-
ncMSMEG0560	–	–	антисенс	635378	635587	210	+
ncMSMEG0651c	–	–	антисенс	733045	732942	104	-
ncMSMEG0671	–	–	антисенс	754460	754617	158	+
ncMSMEG0931	–	–	антисенс	1012296	1012438	143	+
ncMSMEG1219	–	–	антисенс	1289000	1289157	158	+
ncMSMEG1239	–	–	антисенс	1310204	1310436	233	+
ncMSMEG1248c	–	–	антисенс	1324789	1324662	128	-
ncMSMEG1286	AS-5	Li et al., 2013 [13]	антисенс	1377215	1377427	213	+
ncMSMEG1362c	–	–	антисенс	1457286	1457142	145	-
ncMSMEG1429	–	–	антисенс	1532901	1533060	160	+
ncMSMEG1504c	–	–	антисенс	1596468	1596337	132	-
ncMSMEG1717	–	–	антисенс	1814601	1814759	159	+
ncMSMEG1920	–	–	антисенс	2000698	2000763	66	+
ncMSMEG2251c	–	–	антисенс	2333658	2333518	141	-
ncMSMEG2387c	–	–	антисенс	2470602	2470457	146	-
ncMSMEG2423c	–	–	антисенс	2503630	2503457	174	-
ncMSMEG2254	–	–	антисенс	2638875	2639024	150	+
ncMSMEG2583c	–	–	антисенс	2665826	2665729	98	-
ncMSMEG3182	–	–	антисенс	3258011	3257975	37	-
ncMSMEG3452c	–	–	антисенс	3520171	3520017	155	-
ncMSMEG3703c	–	–	антисенс	3767507	3767381	127	-
ncMSMEG3735	–	–	антисенс	3801059	3801223	165	+
ncMSMEG3950c	–	–	антисенс	4019746	4019602	145	-
ncMSMEG4042c	–	–	антисенс	4114596	4114445	152	-
ncMSMEG4053	–	–	антисенс	4125416	4125565	150	+
ncMSMEG4100	–	–	антисенс	4178949	4179098	150	+
ncMSMEG4113	–	–	антисенс	4194388	4194524	137	+
ncMSMEG4302c	–	–	антисенс	4393065	4392628	438	-
ncMSMEG4592c	–	–	антисенс	4684618	4684466	153	-
ncMSMEG4593c	–	–	антисенс	4684937	4684808	130	-
ncMSMEG5526c	–	–	антисенс	5617527	5617373	155	-

Название	Название в литературе	Первое упоминание	Тип	Старт транскрипции	Стоп транскрипции	Длина	Цепь ДНК
ncMSMEG5578	–	–	антисенс	5667415	5667571	157	+
ncMSMEG5956	–	–	антисенс	6016248	6016382	135	+
ncMSMEG6024	–	–	антисенс	6092564	6092713	150	+
ncMSMEG6179c	–	–	антисенс	6248547	6248398	150	-
ncMSMEG6289c	–	–	антисенс	6355048	6354881	168	-
ncMSMEG6316c	–	–	антисенс	6382393	6382235	159	-
ncMSMEG6412	–	–	антисенс	6483711	6483899	189	+
ncMSMEG6430	–	–	антисенс	6499589	6499671	83	+
ncMSMEG6646c	–	–	антисенс	6697778	6697628	151	-

Приложение К

Вторичные структуры выявленных транс-кодируемых нкРНК

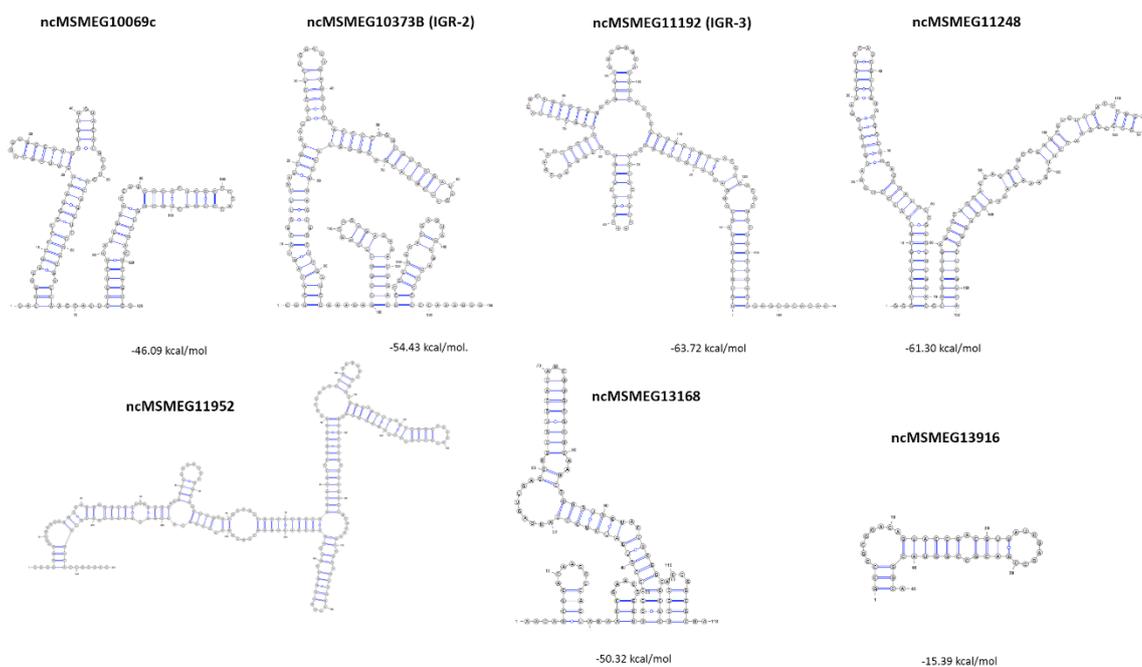


Рисунок К.1 – Предсказанные вторичные структуры выявленных транс-кодируемых нкРНК; рядом с каждой вторичной структурой указана свободная энергия укладки

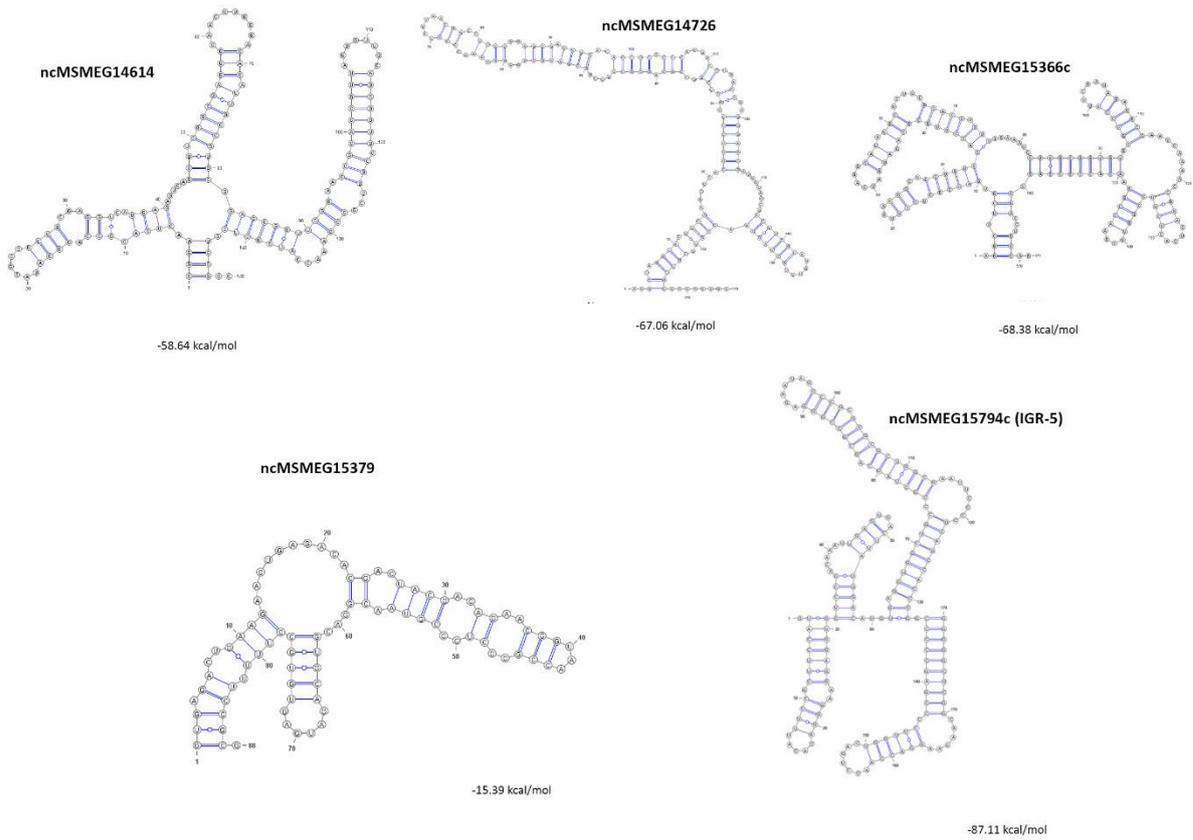


Рисунок К.2 – Предсказанные вторичные структуры выявленных транс-кодируемых нкРНК; рядом с каждой вторичной структурой указана свободная энергия укладки

Приложение Л

Предсказанные мРНК мишени выявленных транс-кодируемых нкРНК

Таблица Л.1 – Список предсказанных мРНК мишеней для выявленных транс-кодируемых нкРНК *M. smegmatis*

Ранг	мРНК Мишень	Е ккал / моль	Р-значение	Вероятность	Продукт
ncMSMEG10069c					
1	MSMEG_1548	-23,43	0	0,36	propanediol utilization: dehydratase, medium subunit
ncMSMEG10373B					
1	MSMEG_3145	-24,36	0	0,39	secreted cell wall-associated hydrolase
ncMSMEG11192					
1	MSMEG_1214	-123,5	0	0,93	oxidoreductase
ncMSMEG11248					
1	MSMEG_0883	-27,27	2,9E-14	0,47	amidohydrolase family protein
2	MSMEG_6879	-24,98	3,4E-09	0,38	integral membrane protein of the ABC-type Nat permease for neutral amino acids NatD
3	MSMEG_0319	-24,53	0,00000002 1	0,37	acyltransferase
4	MSMEG_2297	-28,78	0,00000006 2	0,36	glutaredoxin
ncMSMEG11952					
1	MSMEG_1887	-46,22	0	0,71	hypothetical protein
2	MSMEG_1763	-46,33	0	0,65	leucine-responsive regulatory protein
3	MSMEG_0735	-46,33	0	0,64	putative transcriptional regulator
4	MSMEG_2725	-46,33	0	0,64	glutamate transporter permease protein GluD
5	MSMEG_6914	-45,45	0	0,63	
6	MSMEG_2945	-43,72	0	0,6	
7	MSMEG_2554	-41,22	0	0,6	phosphotransferase enzyme family protein
8	MSMEG_2697	-41,07	0	0,57	conserved hypothetical protein
9	MSMEG_3113	-41,9	0	0,56	carbohydrate kinase, fggy
10	MSMEG_6667	-48,84	0	0,56	conserved hypothetical protein
ncMSMEG13168					
1	MSMEG_6567	-12,74	0,0000074	0,59	iron-dependent peroxidase
2	MSMEG_3179	-23,39	0,000052	0,55	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase f
3	MSMEG_6223	-23,89	0,000093	0,54	TetR family protein transcriptional repressor LfrR
4	MSMEG_6187	-13,41	0,000094	0,54	
5	MSMEG_2553	-24,53	0,000096	0,54	transcriptional regulator, TetR family protein
6	MSMEG_3741	-16,92	0,00025	0,52	transcriptional regulator
7	MSMEG_4974	-17,6	0,00038	0,51	rrf2 family protein (putative transcriptional regulator)
8	MSMEG_4845	-15,44	0,0005	0,5	putative acyl-CoA dehydrogenase
9	MSMEG_1851	-19,83	0,00053	0,5	tRNA ^{Sec}
10	MSMEG_3933	-26,62	0,00056	0,5	conserved hypothetical protein
11	MSMEG_4880	-16,23	0,00058	0,5	methylmalonyl-CoA mutase
12	MSMEG_5687	-17,11	0,00069	0,49	23s ribosomal RNA methyltransferase
13	MSMEG_0688	-16,66	0,0009	0,49	aspartate aminotransferase
14	MSMEG_5513	-13,37	0,0015	0,47	serine/threonine-protein kinase PknE
15	MSMEG_5688	-16,94	0,0016	0,47	regulatory protein, MarR
16	MSMEG_0200	-16,73	0,0017	0,47	hypothetical protein
17	MSMEG_5597	-18,31	0,0017	0,47	transcriptional regulator, TetR family protein
18	MSMEG_1394	-11,54	0,0017	0,47	probable conserved transmembrane protein
19	MSMEG_0883	-22,68	0,0018	0,47	amidohydrolase family protein
20	MSMEG_0451	-12,7	0,0019	0,47	oxidoreductase, FAD-linked

Ранг	мРНК Мишень	Е ккал / моль	Р- значение	Вероятность	Продукт
21	MSMEG_1844	-16,75	0,0019	0,46	conserved hypothetical protein
22	MSMEG_5527	-18,21	0,0019	0,46	conserved hypothetical protein
23	MSMEG_6472	-13,69	0,002	0,46	hypothetical protein
24	MSMEG_4145	-17,78	0,002	0,46	cupin 2 protein
25	MSMEG_3987	-17,66	0,0023	0,46	FAD dependent oxidoreductase
26	MSMEG_3217	-20,15	0,0024	0,46	anthranilate synthase component I
27	MSMEG_1670	-13,09	0,0025	0,46	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit
28	MSMEG_6065	-19,46	0,0026	0,46	Ribosomal protein S18
29	MSMEG_5796	-17,14	0,0026	0,46	Glycine cleavage T0protein
30	MSMEG_2611	-19,19	0,0026	0,46	pyridine nucleotide0disulphide oxidoreductase family protein
31	MSMEG_5383	-14	0,0027	0,46	dehydrogenase/reductase
32	MSMEG_2705	-14,16	0,0027	0,46	hydrogenase expression/formation protein HypE
33	MSMEG_5220	-15,59	0,0027	0,46	esterase/lipase/thioesterase
34	MSMEG_6083	-15,45	0,0027	0,46	base excision DNA repair protein
35	MSMEG_1970	-21,07	0,003	0,45	sigma factor
36	MSMEG_0035	-16,54	0,0031	0,45	FHA domain protein
37	MSMEG_0699	-12,86	0,0032	0,45	conserved hypothetical proline rich protein
38	MSMEG_6222	-17,34	0,0032	0,45	integral membrane protein
ncMSMEG13916					
1	MSMEG_1748	-8,12	0	0,42	conserved hypothetical protein
2	MSMEG_0351	-7,9	0	0,38	virulence factor mce family protein
3	MSMEG_5987	-7,89	0	0,37	two0component regulator
ncMSMEG14614					
1	MSMEG_4695	-57,5	0	0,92	protozoan/cyanobacterial globin family protein
2	MSMEG_0688	-24,81	8E-13	0,46	aspartate aminotransferase
3	MSMEG_4974	-28,75	0	0,39	rrf2 family protein (putative transcriptional regulator)
4	MSMEG_5061	-24,15	0	0,39	Bacterial extracellular solute0binding protein
5	MSMEG_1548	-27,38	0	0,36	propanediol utilization: dehydratase, medium subunit
ncMSMEG14726					
1	MSMEG_2377	-46,98	0	0,6	P49 protein
2	MSMEG_1068	-46,98	0	0,6	regulatory protein
3	MSMEG_0967	-27,11	6,5E-12	0,43	conserved hypothetical protein
4	MSMEG_3770	-23,76	1,1E-09	0,39	argininosuccinate synthase
5	MSMEG_5061	-24,99	2,1E-09	0,39	Bacterial extracellular solute0binding protein
6	MSMEG_1289	-23,81	3,9E-09	0,38	conserved hypothetical protein
7	MSMEG_0030	-28,95	5,4E-09	0,38	
8	MSMEG_6235	-25,09	0,000000028	0,36	thiopurine S0methyltransferase (tpmt) superfamily protein
ncMSMEG15366c					
1	MSMEG_5463	-74,29	0	0,92	60phosphogluconate dehydrogenase, NAD0binding
2	MSMEG_1484	-25,32	0	0,43	adenylate kinase
3	MSMEG_1289	-28,01	9,1E-12	0,36	conserved hypothetical protein
4	MSMEG_5595	-23,54	1,3E-11	0,36	MarR0family protein transcriptional regulator
5	MSMEG_3367	-23,27	4,3E-11	0,36	short0chain dehydrogenase/reductase SDR
ncMSMEG15379					
1	MSMEG_3770	-23,85	0	0,39	
ncMSMEG15794c					
1	MSMEG_2807	-47,15	0,003	0,89	two0component system response regulator
2	MSMEG_0823	-41,85	0,003	0,89	conserved hypothetical protein
3	MSMEG_6567	-23,61	0,0082	0,83	iron0dependent peroxidase
4	MSMEG_4124	-23,99	0,01	0,81	conserved hypothetical protein
5	MSMEG_3191	-24,68	0,01	0,79	conserved hypothetical protein
6	MSMEG_3145	-36,02	0,02	0,79	secreted cell wall0associated hydrolase
7	MSMEG_0409	-24,42	0,02	0,79	Condensation domain protein
8	MSMEG_6187	-21,13	0,02	0,79	endonuclease III
9	MSMEG_1394	-19,63	0,02	0,77	probable conserved transmembrane protein
10	MSMEG_4974	-18,47	0,02	0,77	rrf2 family protein (putative transcriptional regulator)
11	MSMEG_5383	-23,74	0,02	0,77	dehydrogenase/reductase SDR family protein member 4

Ранг	мРНК Мишень	Е ккал / моль	р-значение	Вероятность	Продукт
12	MSMEG_3741	-16,29	0,02	0,76	transcriptional regulator
13	MSMEG_4522	-25,14	0,02	0,76	ISMsm2, transposase
14	MSMEG_4880	-20,61	0,02	0,76	methylmalonylCoA mutase
15	MSMEG_0053	-18,38	0,03	0,75	conserved hypothetical protein
16	MSMEG_2705	-19,6	0,03	0,75	hydrogenase expression/formation protein HypE
17	MSMEG_3777	-23,64	0,03	0,75	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit
18	MSMEG_6065	-24,17	0,03	0,75	ribosomal protein S18
19	MSMEG_5628	-28,9	0,03	0,75	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein
20	MSMEG_1851	-15,58	0,03	0,74	tRNA ^{Sec}
21	MSMEG_0883	-24,14	0,03	0,74	amidohydrolase family protein
22	MSMEG_3705	-19,81	0,03	0,74	major facilitator superfamily protein MFS_1
23	MSMEG_1792	-21,48	0,03	0,74	conserved hypothetical protein
24	MSMEG_6298	-25,88	0,03	0,74	malylCoA lyase
25	MSMEG_1688	-20,07	0,03	0,74	cupin domain protein
26	MSMEG_6083	-20,45	0,03	0,74	base excision DNA repair protein
27	MSMEG_1844	-17,81	0,03	0,73	conserved hypothetical protein
28	MSMEG_4845	-17,82	0,03	0,73	putative acylCoA dehydrogenase
29	MSMEG_4722	-22,55	0,04	0,73	shortchain dehydrogenase
30	MSMEG_6053	-24,91	0,04	0,73	cob(II)yrinic acid a,c-diamide reductase
31	MSMEG_4442	-18,07	0,04	0,73	zincbinding oxidoreductase
32	MSMEG_5220	-17,99	0,04	0,73	esterase/lipase/thioesterase
33	MSMEG_3179	-22,01	0,04	0,73	pyridoxamine 5'phosphate oxidase
34	MSMEG_5527	-16,35	0,04	0,73	conserved hypothetical protein
35	MSMEG_1757	-18,7	0,04	0,73	DEAD/DEAH box helicase
36	MSMEG_0688	-14,9	0,04	0,73	aspartate aminotransferase
37	MSMEG_6259	-24,18	0,04	0,73	ammonium transporter
38	MSMEG_1480	-19,53	0,04	0,72	methyltransferase
39	MSMEG_4179	-21,18	0,04	0,72	probable conserved integral membrane protein
40	MSMEG_4610	-16,74	0,04	0,72	IgiC, putative
41	MSMEG_4035	-20,63	0,04	0,72	citrate synthase
42	MSMEG_5755	-23,61	0,04	0,72	tRNA ^{Phe}
43	MSMEG_4706	-16,34	0,04	0,72	tRNA ^{Arg}
44	MSMEG_4513	-19,75	0,04	0,72	polyketide synthase
45	MSMEG_1670	-13,67	0,04	0,72	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit
46	MSMEG_0699	-17,4	0,04	0,72	conserved hypothetical proline rich protein
47	MSMEG_0241	-26,57	0,04	0,72	MmpL11 protein
48	MSMEG_0451	-14,08	0,04	0,72	oxidoreductase, FAD0linked
49	MSMEG_2413	-14,05	0,04	0,72	putative methyltransferase
50	MSMEG_1098	-20,25	0,04	0,72	acylCoA synthase
51	MSMEG_3582	-25	0,04	0,71	ATP-dependent protease La
52	MSMEG_0653	-22,15	0,04	0,71	conserved hypothetical protein
53	MSMEG_3933	-14,83	0,05	0,71	conserved hypothetical protein
54	MSMEG_2553	-28,83	0,05	0,71	transcriptional regulator, TetR family protein
55	MSMEG_5230	-13,91	0,05	0,71	conserved hypothetical protein
56	MSMEG_3217	-16,41	0,05	0,71	anthranilate synthase component I
57	MSMEG_5218	-16	0,05	0,71	conserved hypothetical protein
58	MSMEG_4096	-13,07	0,05	0,71	nitrotriacetate monooxygenase component A
59	MSMEG_2637	-16,35	0,05	0,71	oxidoreductase
60	MSMEG_2467	-21,33	0,05	0,71	transketolase, central region
61	MSMEG_4111	-17,65	0,05	0,7	alpha0methylacylCoA racemase
62	MSMEG_4163	-16,87	0,05	0,7	30oxoacyl0[acyl0carrier0protein] reductase
63	MSMEG_1598	-17,12	0,05	0,7	conserved hypothetical protein

Приложение М

Список генов, дифференциально экспрессированных в штамме *M. smegmatis* ΔF6Таблица Л.1 – Список дифференциально экспрессированных генов в штамме *M. smegmatis* ΔF6 относительно штамма дикого типа (MSM_WT)

Ген	Название	Продукт	Log2FC	P-Значение	FDR
MSMEG_0149	MSMEG_0149	ThiC family protein	4,77	3,32E-06	0,004102114
MSMEG_0150	MSMEG_0150	NAD(P) transhydrogenase beta subunit	4,87	1,51E-05	0,010380558
MSMEG_0151	MSMEG_0151	PntAB protein	5,30	1,24E-06	0,004102114
MSMEG_0152	MSMEG_0152	Alanine dehydrogenase/pyridine nucleotide transhydrogenase	4,61	3,72E-05	0,023307558
MSMEG_0153	panE	2-dehydropantoate reductase	4,03	4,53E-05	0,024029849
MSMEG_0154	pyk	pyruvate kinase	4,08	4,54E-05	0,024029849
MSMEG_0156	MSMEG_0156	transcriptional regulator	3,86	5,89E-05	0,028246876
MSMEG_0157	MSMEG_0157	oxalyl-CoA decarboxylase	5,76	2,20E-06	0,004102114
MSMEG_0158	MSMEG_0158	formyl-coenzyme transferase A	5,51	2,72E-06	0,004102114
MSMEG_0159	MSMEG_0159	formate dehydrogenase	4,90	5,12E-06	0,004584912
MSMEG_0160	MSMEG_0160	formate dehydrogenase	5,27	1,20E-05	0,009199993
MSMEG_0161	MSMEG_0161	formate dehydrogenase	5,15	5,33E-06	0,004584912
MSMEG_0162	MSMEG_0162	NAD-dependent formate dehydrogenase delta subunit	4,92	3,58E-06	0,004102114
MSMEG_0168	MSMEG_0168	formyl-coenzyme transferase A	4,27	6,15E-05	0,028246876
MSMEG_4640	MSMEG_4640	secreted protein	3,83	6,61E-09	4,55E-05

Приложение Н

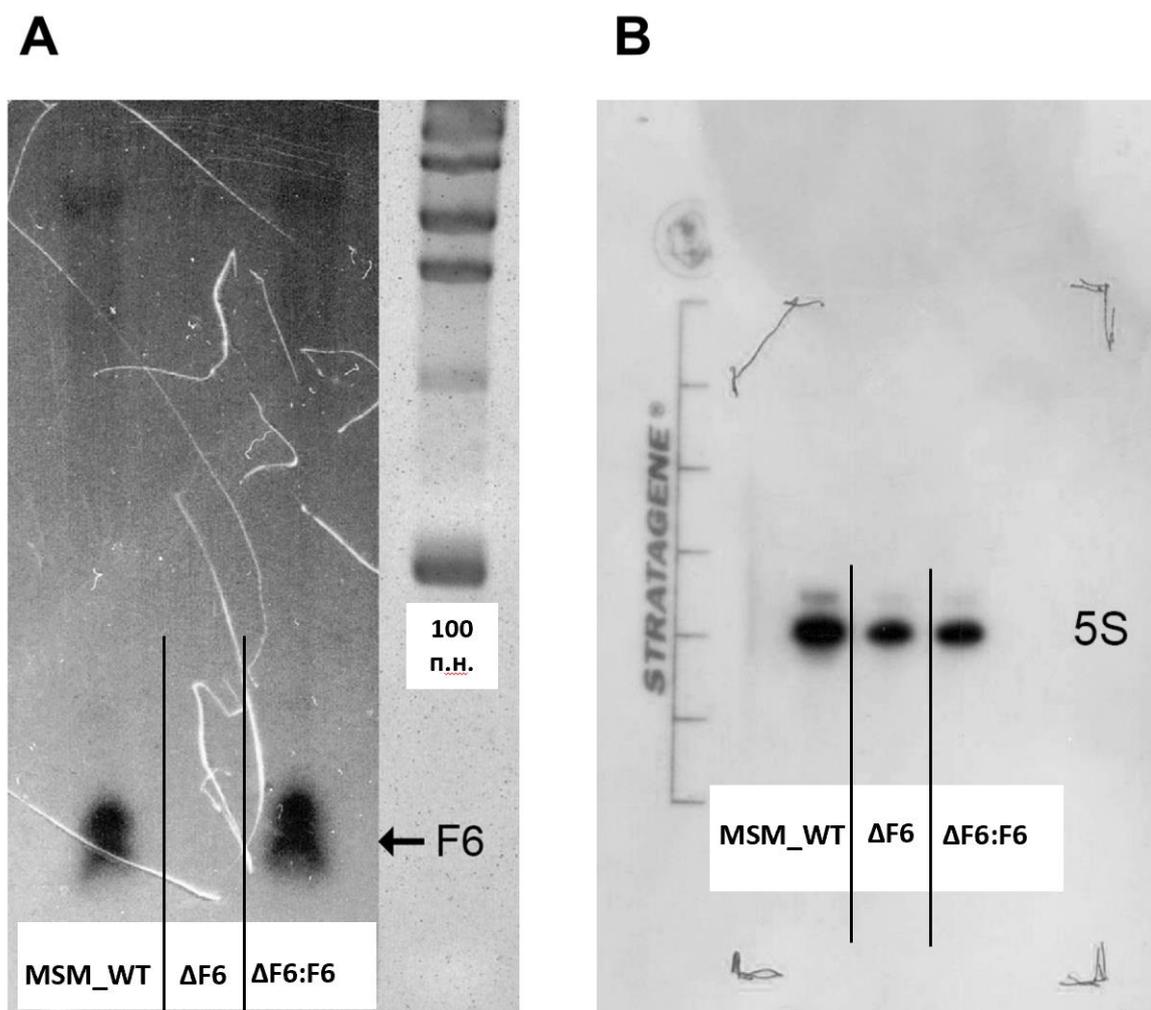
Оценка транскрипции F6 в мутантном ($\Delta F6$) и комплементированном ($\Delta F6:F6$) штаммах
M. smegmatis

Рисунок Н.1 – (А) Результаты нозерн-блота, демонстрирующие транскрипцию F6 в MSM_WT, $\Delta F6$ и $\Delta F6:F6$ штаммах; (В) Результаты нозерн-блота, демонстрирующие транскрипцию 5S в MSM_WT, $\Delta F6$ и $\Delta F6:F6$ штаммах;

Приложение II

Список предсказанных мРНК мишеней для малой РНК F6 *M. smegmatis*

Таблица II.1 – Список предсказанных мРНК мишеней для малой РНК F6 *M. smegmatis*; подтвержденная мишень (*MSMEG_4640*) выделена зеленым цветом

Ранг	СopraRNA р-значение	Ген	Е ккал / моль	Позиция мРНК	Позиция нкРНК	Продукт
1	0,001884	MSMEG_6173	-16,67	15 -- 23	24 -- 32	HAD-IB family hydrolase
2	0,006281	MSMEG_1403	-16,09	173 -- 182	27 -- 36	cutinase family protein
3	0,008564	MSMEG_4640	-13,57	180 -- 187	28 -- 35	transglycosylase family protein
4	0,01995	MSMEG_2084	-14,12	63 -- 76	24 -- 35	
5	0,02293	MSMEG_5264	-17,71	192 -- 200	26 -- 34	GPP34 family phosphoprotein
6	0,02618	MSMEG_1577	-11,40	65 -- 72	27 -- 34	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex ATPase subunit type 1 TsaE
7	0,02731	MSMEG_2793	-16,64	102 -- 110	27 -- 35	HAMP domain-containing histidine kinase
8	0,02733	MSMEG_1535	-13,72	190 -- 197	25 -- 32	type VII secretion integral membrane protein EccD
9	0,03128	MSMEG_6354	-8,90	237 -- 243	30 -- 36	cutinase family protein
10	0,04063	MSMEG_6022	-10,04	235 -- 242	29 -- 36	ROK family transcriptional regulator
11	0,0464	MSMEG_1339	-13,69	136 -- 147	24 -- 35	50S ribosomal protein L33
12	0,04821	MSMEG_1212	-11,31	63 -- 69	27 -- 33	
13	0,05123	MSMEG_6180	-9,14	186 -- 199	24 -- 36	S1 family peptidase
14	0,06858	MSMEG_5231	-12,29	8 -- 14	27 -- 33	
15	0,07206	MSMEG_5174	-12,05	150 -- 164	22 -- 36	GntR family transcriptional regulator
16	0,07236	MSMEG_1945	-8,97	28 -- 37	27 -- 35	potassium channel family protein
17	0,07373	MSMEG_0423	-5,78	36 -- 43	29 -- 36	
18	0,07731	MSMEG_4293	-12,80	43 -- 50	27 -- 34	bifunctional [glutamine synthetase] adenylyltransferase/[glutamine synthetase]-adenylyl-L-tyrosine phosphorylase
19	0,07827	MSMEG_5258	-14,04	150 -- 157	28 -- 35	nuclear transport factor 2 family protein
20	0,07845	MSMEG_4896	-11,10	203 -- 220	26 -- 36	fatty acyl-AMP ligase

Приложение P

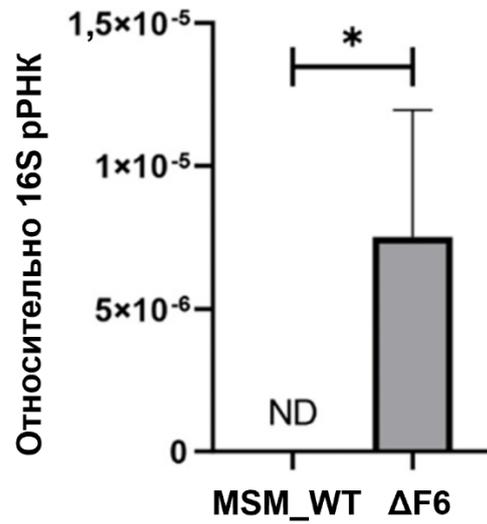
Транскрипция гена *MSMEG_4640* в модели покоя *M. smegmatis*

Рисунок P.1 – Оценка транскрипции гена *MSMEG_4640* методом ОТ-ПЦР в модели покоя в штаммах MSM_WT и ΔF6; * $p < 0,05$, ND – транскрипция не детектирована

Приложение С

**Дифференциально экспрессированные гены в *M. tuberculosis* при гиперэкспрессии
MTS1338**

Таблица С.1 – Дифференциально экспрессированные гены в штамме *mtb_pMV261_1338* относительно штамма *mtb_pMV261_E* в условиях нитрозативного стресса (0,5 мМ DETA NONOate)

Ген	Название	Функция	Продукт	Log2FC	p _{adj}
Rv0032	bioF2	Could be involved in biotin biosynthesis	Possible 8-amino-7-oxononanoate synthase BioF2	-1,53	1,19E-45
Rv0033	acpA	The carrier of the growing fatty acid chain in fatty acid biosynthesis	Probable acyl carrier protein AcpA (ACP)	-1,91	7,73E-24
Rv0034	Rv0034	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,89	9,20E-26
Rv0035	fadD34	Involved in lipid degradation	fatty-acid-CoA synthase	-1,97	2,71E-63
Rv0169	mce1A	May be involved in host cell invasion	Mce-family protein Mce1A	-1,59	3,25E-64
Rv0170	mce1B	May be involved in host cell invasion	Mce-family protein Mce1B	-1,59	2,86E-59
Rv0172	mce1D	May be involved in host cell invasion	Mce-family protein Mce1D	-1,54	6,26E-64
Rv0173	lprK	May be involved in host cell invasion	Possible Mce-family lipoprotein LprK	-1,66	2,53E-57
Rv0186A	mymT	Protects cell from copper toxicity	Metallothionein	1,53	1,78E-03
Rv0196	Rv0196	Possibly involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,83	1,97E-51
Rv0251c	hsp	Thought to be involved in the initiation step of translation at high temperature.	Heat shock protein Hsp (heat-stress-induced ribosome-binding protein A)	2,29	4,25E-19
Rv0384c	clpB	Thought to be an ATPase subunit of an intracellular ATP-dependent protease	Probable endopeptidase ATP binding protein (chain B) ClpB (ClpB protein)	1,61	2,73E-12
Rv0448c	Rv0448c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,64	3,50E-11
Rv0620	galK	Involved in galactose metabolism	Probable galactokinase GalK	2,15	1,06E-06
Rv0623	vapB30	Unknown	Possible antitoxin VapB30	2,09	6,70E-35
Rv0624	vapC30	Unknown	Possible toxin VapC30	1,54	2,75E-20
Rv0724A	Rv0724A	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,59	9,49E-12
Rv0792c	Rv0792c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,80	5,75E-08
Rv0793	Rv0793	Function unknown	Possible monooxygenase	2,40	8,09E-12
Rv0826	Rv0826	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,60	5,19E-07
Rv0827c	kmtR	Involved in transcriptional mechanism	Metal sensor transcriptional regulator KmtR	1,93	5,06E-28
Rv0830	Rv0830	Possible methyltransferase	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2,08	4,39E-39
Rv0841	Rv0841	Unknown	Probable conserved transmembrane protein	2,41	1,20E-05
Rv0967	csoR	Involved in transcriptional mechanism	Copper-sensitive operon repressor CsoR	1,80	4,05E-07
Rv0968	Rv0968	Function unknown	Conserved protein	1,72	8,01E-34
Rv1044	Rv1044	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,79	5,88E-19
Rv1048c	Rv1048c	Unknown	Hypothetical protein	1,52	5,78E-18
Rv1157c	Rv1157c	Function unknown	Conserved ala-	-1,87	1,42E-50
Rv1158c	Rv1158c	Function unknown	Conserved hypothetical ala-	-1,83	1,01E-44
Rv1169c	lipX	Function unknown	PE family protein. Possible lipase LipX.	1,67	7,72E-38
Rv1219c	Rv1219c	Involved in transcriptional mechanism.	Probable transcriptional regulatory protein	1,87	8,52E-84
Rv1285	cysD	Involved in sulfate activation pathway.	Probable sulfate adenylyltransferase subunit 2 CysD	1,65	1,68E-59
Rv1386	PE15	Function unknown	PE family protein PE15	1,89	1,65E-42
Rv1387	PPE20	Function unknown	PPE family protein PPE20	1,64	3,42E-59
Rv1395	Rv1395	Involved in transcriptional mechanism	Transcriptional regulatory protein	2,53	7,21E-21
Rv1528c	papA4	May be involved in lipid metabolism.	Probable conserved polyketide synthase	1,92	2,72E-30
Rv1674c	Rv1674c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,73	5,16E-13
Rv1697	Rv1697	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,66	5,11E-61
Rv1801	PPE29	Function unknown	PPE family protein PPE29	2,69	1,56E-20
Rv1806	PE20	Function unknown	PE family protein PE20	2,15	3,20E-16
Rv1807	PPE31	Function unknown	PPE family protein PPE31	1,70	1,22E-21
Rv1909c	furA	Global negative controlling element	Ferric uptake regulation protein FurA	2,11	1,07E-66
Rv1964	yrbE3A	Unknown	Conserved hypothetical integral membrane protein	1,51	4,12E-15
Rv1989c	Rv1989c	Unknown	Hypothetical protein	1,91	1,60E-34
Rv1990c	Rv1990c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	2,13	2,53E-15
Rv1991A	mazE6	Unknown	Antitoxin MazE6	1,84	1,40E-06
Rv1991c	mazF6	Sequence-specific mRNA cleavage	Toxin MazF6	1,96	4,89E-08
Rv1994c	cmtR	Involved in transcriptional mechanism	Metal sensor transcriptional regulator CmtR	1,88	8,09E-06
Rv1995	Rv1995	Unknown	Unknown protein	1,66	1,09E-06

Ген	Название	Функция	Продукт	Log2FC	Padj
Rv2013	Rv2013	Required for the transposition of an insertion element	Transposase	1,58	1,38E-03
Rv2016	Rv2016	Unknown	Hypothetical protein	1,65	2,40E-42
Rv2034	Rv2034	Involved in transcriptional regulation	ArsR repressor protein	3,45	1,72E-18
Rv2035	Rv2035	Unknown	Conserved hypothetical protein	2,41	1,27E-14
Rv2036	Rv2036	Unknown	Conserved hypothetical protein	1,50	2,70E-20
Rv2122c	hisE	Involved in histidine biosynthesis	Phosphoribosyl-AMP pyrophosphatase HisE	2,17	4,70E-42
Rv2123	PPE37	Function unknown	PPE family protein PPE37	2,46	2,98E-08
Rv2250A	Rv2250A	Electron acceptor	Possible flavoprotein	1,58	4,57E-20
Rv2250c	Rv2250c	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,53	1,51E-11
Rv2327	Rv2327	Function unknown	Conserved protein	1,72	2,03E-64
Rv2641	cadI	Function unknown	Cadmium inducible protein CadI	3,26	1,88E-09
Rv2642	Rv2642	Involved in transcriptional mechanism.	Possible transcriptional regulatory protein	2,79	9,98E-11
Rv2643	arsC	Involved in transport of arsenic compounds across the membrane	Probable arsenic-transport integral membrane protein ArsC	2,13	3,91E-10
Rv2662	Rv2662	Unknown	Hypothetical protein	2,83	1,02E-20
Rv2875	mpt70	Unknown	Major secreted immunogenic protein Mpt70	2,78	4,23E-19
Rv2963	Rv2963	Unknown	Probable integral membrane protein	1,55	6,30E-05
Rv2989	Rv2989	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,95	7,91E-04
Rv3054c	Rv3054c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,51	5,28E-14
Rv3182	Rv3182	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,24	2,72E-30
Rv3183	Rv3183	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	2,15	3,53E-24
Rv3188	Rv3188	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,08	5,82E-46
Rv3189	Rv3189	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,87	1,26E-51
Rv3334	Rv3334	Involved in a transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,61	1,85E-55
Rv3428c	Rv3428c	Involved in the transposition of the insertion sequence IS1532	Possible transposase	1,92	1,10E-05
Rv3477	PE31	Function unknown	PE family protein PE31	-1,73	1,80E-42
Rv3487c	lipF	Involved in cellular metabolism	Probable esterase/lipase LipF	-1,61	9,64E-48
Rv3657c	Rv3657c	Unknown	Possible conserved alanine rich membrane protein	1,50	2,70E-10
Rv3659c	Rv3659c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,14	1,72E-07
Rv3660c	Rv3660c	Possibly plays a regulatory role in cellular differentiation	Conserved hypothetical protein	2,14	1,04E-09
Rv3751	Rv3751	Sequence integration	Probable integrase (fragment)	1,84	1,44E-10
Rv3839	Rv3839	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,24	2,00E-09
Rv3840	Rv3840	Supposedly involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	2,10	1,30E-09
Rv3854c	ethA	Activates the pro-drug ethionamide (ETH)	Monooxygenase EthA	1,74	2,54E-75
Rv3862c	whiB6	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein WhiB-like WhiB6	1,85	7,06E+03

Таблица С.2 – Дифференциально экспрессированные гены в штамме *mtb_pMV261_1338* относительно штамма *mtb_pMV261_E* в условиях кислотного стресса (рН 5,5)

Ген	Название	Функция	Продукт	Log2FC	Padj
Rv0136	cyp138	Function unknown	Probable cytochrome P450 138 Cyp138	1,59	2,96E-72
Rv0140	Rv0140	Function unknown	Conserved protein	1,55	1,92E-08
Rv0142	Rv0142	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,80	2,16E-12
Rv0251c	hsp	Thought to be involved in the initiation step of translation at high temperature.	Heat shock protein Hsp (heat-stress-induced ribosome-binding protein A)	2,32	1,61E-109
Rv0252	nirB	Involved in nitrate assimilation	Probable nitrite reductase NirB	-2,36	4,94E-28
Rv0253	nirD	Involved in nitrate assimilation	Probable nitrite reductase NirD	-2,17	3,51E-55
Rv0259c	Rv0259c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,59	8,42E-23
Rv0260c	Rv0260c	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	-2,32	2,41E-40
Rv0341	iniB	Unknown	Isoniazid inducible gene protein IniB	2,06	7,36E-20
Rv0516c	Rv0516c	Involved in transcriptional mechanism	Possible anti-anti-sigma factor	1,61	4,13E-31
Rv0620	galK	Involved in galactose metabolism	Probable galactokinase GalK (galactose kinase)	2,00	2,55E-05
Rv0623	vapB30	Unknown	Possible antitoxin VapB30	1,91	3,34E-14
Rv0624	vapC30	Unknown	Possible toxin VapC30. Contains PIN domain	1,51	1,19E-05
Rv0792c	Rv0792c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,70	4,87E-30
Rv0793	Rv0793	Function unknown	Possible monooxygenase	2,02	1,10E-19
Rv0826	Rv0826	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,95	5,27E-08
Rv0841	Rv0841	Unknown	Probable conserved transmembrane protein	1,85	8,74E-04
Rv0989c	grcC2	Possible supplier of polyprenyl diphosphat	Probable polyprenyl-diphosphate synthase GrcC2	1,99	1,43E-07
Rv1044	Rv1044	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,77	4,49E-08
Rv1195	PE13	Function unknown	PE family protein PE13	-2,62	1,80E-99
Rv1196	PPE18	Function unknown	PPE family protein PPE18	-2,49	4,36E-23
Rv1197	esxK	Function unknown	ESAT-6 like protein EsxK	-2,34	4,92E-24
Rv1198	esxL	Unknown	Putative ESAT-6 like protein EsxL	-2,02	4,71E-15
Rv1357c	Rv1357c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,82	1,77E-01
Rv1361c	PPE19	Function unknown	PPE family protein PPE19	-1,90	3,50E-86
Rv1395	Rv1395	Involved in transcriptional mechanism	Transcriptional regulatory protein	2,01	2,48E-16
Rv1528c	papA4	May to be involved in lipid metabolism	Probable conserved polyketide synthase	1,68	1,47E-21
Rv1542c	glbN	Oxygen transport	Hemoglobin GlbN	-2,59	1,10E-51
Rv1552	frdA	Interconversion of fumarate and succinate	Probable fumarate reductase	1,55	1,65E-04
Rv1801	PPE29	Function unknown	PPE family protein PPE29	2,62	8,24E-17
Rv1909c	furA	Global negative controlling element	Ferric uptake regulation protein FurA	1,97	1,31E-16
Rv1954A	Rv1954A	Unknown	Hypothetical protein	1,84	3,24E-79
Rv1955	higB	Unknown	Possible toxin HigB	1,68	3,21E-08
Rv1989c	Rv1989c	Unknown	Hypothetical protein	1,79	3,86E-37
Rv1990A	Rv1990A	May involved in cellular metabolism	Possible dehydrogenase (fragment)	1,86	9,44E-24
Rv1990c	Rv1990c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	2,11	2,88E-13
Rv1991A	mazE6	Unknown	Antitoxin MazE6	2,00	6,38E-08
Rv1991c	mazF6	Sequence-specific mRNA cleavage	Toxin MazF6	2,04	6,36E-09
Rv1993c	Rv1993c	Function unknown	Conserved protein	1,62	5,20E-08
Rv1994c	cmtR	Involved in transcriptional mechanism	Metal sensor transcriptional regulator CmtR	2,17	4,32E-07
Rv2034	Rv2034	Involved in transcriptional regulation	ArsR repressor protein	2,68	7,43E-11
Rv2035	Rv2035	Unknown	Conserved hypothetical protein	1,90	1,24E-08
Rv2123	PPE37	Function unknown	PPE family protein PPE37	1,61	3,01E-18
Rv2250c	Rv2250c	Involved in transcriptional regulation	Possible transcriptional regulatory protein	1,73	4,22E-13
Rv2320c	rocE	Man be involved in transport of amino acid	Probable cationic amino acid transport protein	-1,56	5,76E-39
Rv2464c	Rv2464c	Hydrolyses DNA	Possible DNA glycosylase	1,51	1,73E-11
Rv2466c	Rv2466c	Function unknown	Conserved protein	1,85	9,69E-18
Rv2641	cadI	Function unknown	Cadmium inducible protein CadI	2,00	4,48E-06
Rv2642	Rv2642	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	2,23	4,06E-09
Rv2643	arsC	Involved in transport of arsenic compounds across the membrane	Probable arsenic-transport integral membrane protein ArsC	1,82	1,19E-08
Rv2768c	PPE43	Function unknown	PPE family protein PPE43	-1,54	5,31E-48
Rv2769c	PE27	Function unknown	PE family protein PE27	-1,65	1,31E-56
Rv2875	mpt70	Unknown	Major secreted immunogenic protein Mpt70	2,36	9,99E-10
Rv3054c	Rv3054c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,77	1,53E-21
Rv3182	Rv3182	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,73	1,08E-17
Rv3183	Rv3183	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,76	1,31E-16
Rv3188	Rv3188	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,81	8,90E-14
Rv3189	Rv3189	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,56	2,31E-28
Rv3334	Rv3334	Involved in a transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,60	3,60E-60
Rv3428c	Rv3428c	Involved in the transposition	Possible transposase	1,56	3,56E-06
Rv3659c	Rv3659c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,11	2,69E-28
Rv3741c	Rv3741c	Probably involved in cellular metabolism	Possible oxidoreductase	-1,54	1,92E-40
Rv3742c	Rv3742c	Probably involved in cellular metabolism	Possible oxidoreductase	-1,52	6,98E-43

Таблица С.3 – Дифференциально экспрессированные гены в штамме *mtb_pMV261_1338* относительно штамма *mtb_pMV261_E* в условиях окислительного стресса (10 mM H₂O₂)

Ген	Название	Функция	Продукт	Log2FC	Padj
Rv0095c	Rv0095c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,64	3,80E-36
Rv0188	Rv0188	Unknown	Probable conserved transmembrane protein	-1,54	2,85E-34
Rv0259c	Rv0259c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,66	1,31E-16
Rv0260c	Rv0260c	Could be involved in transcriptional mechanism.	Possible transcriptional regulatory protein	-1,96	1,92E-19
Rv0620	galK	Involved in galactose metabolism	Probable galactokinase GalK (galactose kinase)	2,14	2,01E-08
Rv0791c	Rv0791c	Function unknown	Conserved protein	1,71	1,44E-07
Rv0792c	Rv0792c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein (probably GntR-family)	1,97	7,97E-08
Rv0793	Rv0793	Function unknown	Possible monooxygenase	2,68	4,32E-12
Rv0826	Rv0826	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,32	6,05E-06
Rv0829	Rv0829	Required for the transposition of the insertion element IS1605	Possible transposase (fragment)	-1,63	4,68E-22
Rv1129c	Rv1129c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulator protein	2,57	9,06E-93
Rv1130	prpD	Involved in methyl citrate cycle	Possible methylcitrate dehydratase PrpD	1,72	6,27E-50
Rv1131	prpC	Involved in methyl citrate cycle	Probable methylcitrate synthase PrpC	1,73	7,20E-48
Rv1278	Rv1278	Unknown	Hypothetical protein	-1,56	1,15E-59
Rv1279	Rv1279	Probably involved in cellular metabolism	probably electron-transfer-linked.	-1,60	8,90E-73
Rv1395	Rv1395	Involved in transcriptional mechanism	Transcriptional regulatory protein	1,65	1,42E-32
Rv1473	Rv1473	Thought to be involved in active transport of macrolide across the membrane (export)	Probable macrolide-transport ATP-binding protein ABC transporter	1,69	8,35E-69
Rv1473A	Rv1473A	Possibly involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,56	2,16E-46
Rv1542c	glbN	Oxygen transport	Hemoglobin Gln	-1,71	1,94E-15
Rv1665	pkc11	Possibly involved in the biosynthesis of secondary metabolites	Chalcone synthase Pks11	-1,62	1,12E-34
Rv1765c	Rv1765c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,64	5,91E-40
Rv1790	PPE27	Function unknown	PPE family protein PPE27	1,51	3,23E-19
Rv1806	PE20	Function unknown	PE family protein PE20	-1,71	1,21E-10
Rv1807	PPE31	Function unknown	PPE family protein PPE31	-1,94	8,45E-14
Rv1994c	cmtR	Involved in transcriptional regulation	Metal sensor transcriptional regulator CmtR	1,58	1,69E-30
Rv2015c	Rv2015c	Unknown	Conserved hypothetical protein	-1,65	4,79E-41
Rv2034	Rv2034	Involved in transcriptional regulation	ArsR repressor protein	2,58	1,29E-10
Rv2035	Rv2035	Unknown	Conserved hypothetical protein	1,56	2,54E-05
Rv2422	Rv2422	Unknown	Hypothetical protein	1,75	6,17E-06
Rv2464c	Rv2464c	Hydrolyses DNA	Possible DNA glycosylase	1,57	1,57E-49
Rv2617c	Rv2617c	Unknown	Probable transmembrane protein	-2,43	2,16E-11
Rv2641	cadI	Function unknown	Cadmium inducible protein CadI	2,17	2,49E-18
Rv2642	Rv2642	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,91	4,79E-41
Rv2875	mpt70	Unknown	Major secreted immunogenic protein Mpt70	2,09	1,77E-62
Rv3201c	Rv3201c	Has both ATPase and helicase activities	Probable ATP-dependent DNA helicase	-1,51	3,76E-40
Rv3229c	desA3	Thought to be involved in lipid metabolism	Possible linoleoyl-CoA desaturase	-1,57	1,13E-62
Rv3289c	Rv3289c	Unknown	Possible transmembrane protein	-1,81	2,84E-86
Rv3290c	lat	Possibly involved in L-alpha-aminoadipic acid (L-AAA) biosynthesis	Probable L-lysine-epsilon aminotransferase Lat	-1,84	1,83E-123
Rv3371	Rv3371	May be involved in synthesis of triacylglycerol	Possible triacylglycerol synthase (diacylglycerol acyltransferase)	-1,60	3,53E-30
Rv3659c	Rv3659c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,70	1,22E-20
Rv3660c	Rv3660c	Possibly plays a regulatory role in cellular differentiation	Conserved hypothetical protein	2,05	4,71E-68
Rv3862c	whiB6	Involved in transcriptional mechanism.	Possible transcriptional regulatory protein WhiB-like WhiB6	1,69	1,30E-46

Таблица С.4 – Дифференциально экспрессированные гены в штамме *mtb_rMV261_1338* относительно штамма *mtb_rMV261_E* в контрольных условиях (без стресса)

Ген	Название	Функция	Продукт	Log2FC	Padj
Rv0033	acrA	The carrier of the growing fatty acid chain in fatty acid biosynthesis	Probable acyl carrier protein AcrA (ACP)	-1,57	1,73E-13
Rv0034	Rv0034	Function unknown	Conserved hypothetical protein	-1,53	1,42E-16
Rv0142	Rv0142	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,60	9,41E-05
Rv0168	yrbE1B	Unknown	Conserved integral membrane protein YrbE1B	-1,67	9,30E-40
Rv0169	mce1A	May be involved in host cell invasion	Mce-family protein Mce1A	-1,61	1,28E-45
Rv0196	Rv0196	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	1,56	2,41E-24
Rv0251c	hsp	Thought to be involved in the initiation step of translation at high temperature.	Heat shock protein Hsp (heat-stress-induced ribosome-binding protein A)	2,59	2,33E-68
Rv0384c	clpB	Thought to be an ATPase subunit of an intracellular ATP-dependent protease	Probable endopeptidase ATP binding protein (chain B) ClpB (ClpB protein)	1,69	5,93E-07
Rv0612	Rv0612	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,71	4,04E-17
Rv0620	galK	Involved in galactose metabolism	Probable galactokinase GalK (galactose kinase)	1,50	1,98E-04
Rv0623	vapB30	Unknown	Possible antitoxin VapB30	1,53	1,98E-14
Rv0724A	Rv0724A	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,88	1,32E-19
Rv0725c	Rv0725c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,86	2,75E-56
Rv0792c	Rv0792c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,59	1,36E-11
Rv0826	Rv0826	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,38	5,61E-07
Rv0830	Rv0830	Possible methyltransferase	Methyltransferase	1,67	4,63E-17
Rv0841	Rv0841	Unknown	Probable conserved transmembrane protein	2,93	6,02E-06
Rv0989c	grcC2	Possible supplier of polyprenyl diphosphate	Probable polyprenyl-diphosphate synthase GrcC2	2,05	2,48E-02
Rv1357c	Rv1357c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,44	1,42E-16
Rv1395	Rv1395	Involved in transcriptional mechanism	Transcriptional regulatory protein	2,30	1,43E-10
Rv1460	Rv1460	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,65	1,03E-27
Rv1528c	papA4	May to be involved in lipid metabolism	Probable conserved polyketide synthase	1,82	1,83E-16
Rv1674c	Rv1674c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	1,77	3,65E-08
Rv1754c	Rv1754c	Function unknown	Conserved protein	-1,64	3,37E-26
Rv1790	PPE27	Function unknown	PPE family protein PPE27	1,51	1,05E-21
Rv1801	PPE29	Function unknown	PPE family protein PPE29	2,84	1,90E-11
Rv1806	PE20	Function unknown	PE family protein PE20	1,86	1,22E-13
Rv1954A	Rv1954A	Unknown	Hypothetical protein	1,74	4,82E-28
Rv1955	higB	Unknown	Possible toxin HigB	1,52	6,16E-03
Rv1989c	Rv1989c	Unknown	Hypothetical protein	1,99	3,44E-08
Rv1990c	Rv1990c	Involved in transcriptional mechanism	Probable transcriptional regulatory protein	2,04	5,16E-09
Rv1991A	mazE6	Unknown	Antitoxin MazE6	1,76	8,41E-12
Rv1991c	mazF6	Sequence-specific mRNA cleavage	Toxin MazF6	1,77	1,13E-06
Rv1993c	Rv1993c	Function unknown	Conserved protein	1,88	1,15E-03
Rv1994c	cmtR	Involved in transcriptional mechanism	Metal sensor transcriptional regulator CmtR	2,14	4,24E-05
Rv2013	Rv2013	Required for the transposition	Transposase	1,74	1,57E-03
Rv2034	Rv2034	Involved in transcriptional regulation	ArsR repressor protein	3,08	1,56E-14
Rv2035	Rv2035	Unknown	Conserved hypothetical protein	2,13	1,47E-09
Rv2123	PPE37	Function unknown	PPE family protein PPE37	1,96	7,50E-21
Rv2327	Rv2327	Function unknown	Conserved protein	1,65	3,19E-69
Rv2353c	PPE39	Function unknown	PPE family protein PPE39	1,72	5,49E-03
Rv2641	cadI	Function unknown	Cadmium inducible protein CadI	2,21	2,03E-04
Rv2642	Rv2642	Involved in transcriptional mechanism	Possible transcriptional regulatory protein	2,20	1,11E-06
Rv2643	arsC	Involved in transport of arsenic compounds across the membrane (export)	Probable arsenic-transport integral membrane protein ArsC	1,82	4,33E-06
Rv2656c	Rv2656c	Unknown	Possible PhiRv2 prophage protein	1,52	6,71E-18
Rv2662	Rv2662	Unknown	Hypothetical protein	2,88	1,51E-22
Rv2737A	Rv2737A	Function unknown	Conserved hypothetical cysteine rich protein	1,65	6,06E-04
Rv2875	mpt70	Unknown	Major secreted immunogenic protein Mpt70	2,51	3,14E-13
Rv3054c	Rv3054c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	3,17	2,14E-09
Rv3061c	fadE22	Function unknown	but involved in lipid degradation	1,52	2,37E-07
Rv3182	Rv3182	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,23	1,14E-17
Rv3183	Rv3183	Involved in transcriptional mechanism.	Possible transcriptional regulatory protein	2,34	1,79E-18
Rv3188	Rv3188	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,59	2,44E-17
Rv3189	Rv3189	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,57	3,52E-18
Rv3659c	Rv3659c	Function unknown	Conserved hypothetical protein	2,02	1,06E-05
Rv3660c	Rv3660c	May play a regulatory role in celular differentiation	Conserved hypothetical protein	2,52	1,34E-46
Rv3751	Rv3751	Sequence integration	Probable integrase (fragment)	1,67	9,81E-09
Rv3839	Rv3839	Function unknown	Conserved hypothetical protein	1,58	3,46E-11
Rv3848	Rv3848	Unknown	Probable conserved transmembrane protein	1,62	8,67E-28

Приложение Т

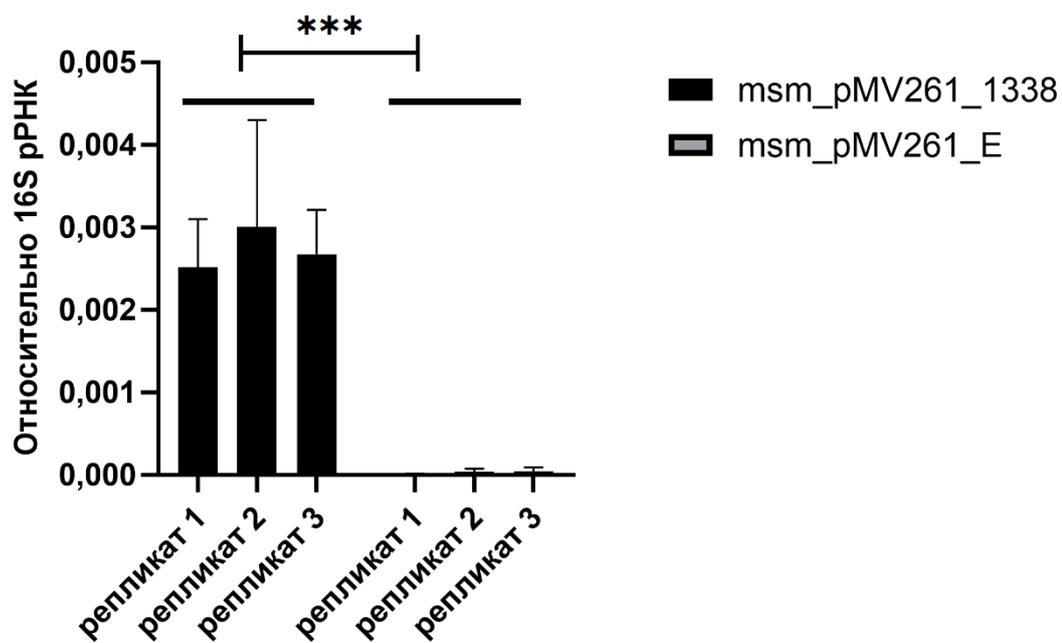
Подтверждение транскрипции MTS1338 в *M. smegmatis*

Рисунок Т.1 – Подтверждение транскрипции MTS1338 штамме, трансформированном конструкцией для гетерологичной транскрипции (*msm_pMV261_MTS1338*) методом количественной ОТ-ПЦР; *** $p < 0,001$

Приложение У

**Различия в протеомах штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией
MTS1338 и штамма с контрольным вектором**

Таблица У.1 – Белки, обнаруженных в протеоме только штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией MTS1338 (msm_pMV261_1338)

Номер Uniprot	Покрывтие (%)	Пептиды	Уникальные пептиды	Продукт
I7FU37 I7FU37 MYCS2	58	37	37	Lysine--tRNA ligase
A0QWY4 A0QWY4 MYCS2	56	14	14	Uncharacterized protein
I7FDS2 I7FDS2 MYCS2	46	9	9	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA
I7FI52 I7FI52 MYCS2	8	9	9	Uncharacterized protein
A0QR04 A0QR04 MYCS2	38	9	9	Ppx/GppA phosphatase family protein
I7FHX4 I7FHX4 MYCS2	28	5	5	Uncharacterized protein
I7GFZ1 I7GFZ1 MYCS2	24	4	4	Acyl-CoA dehydrogenase FadE33
sp A0QP90 G6PD MYCS2	22	8	7	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
I7FCH5 I7FCH5 MYCS2	17	5	5	Transposase IS4 family protein
I7FZA1 I7FZA1 MYCS2	26	7	7	Pyridoxal phosphate homeostasis protein
A0QR86 A0QR86 MYCS2	27	5	5	Putative acetyltransferase
A0QW26 A0QW26 MYCS2	35	1	1	Uncharacterized protein
A0QNK6 A0QNK6 MYCS2	30	4	4	Uncharacterized protein
I7GAW4 I7GAW4 MYCS2	17	6	6	Cytochrome P450 138 cyp138
I7G5C5 I7G5C5 MYCS2	28	7	7	Alcohol dehydrogenase zinc-containing putative
I7FNF9 I7FNF9 MYCS2	27	9	9	Propionyl-CoA carboxylase
A0R0X3 A0R0X3 MYCS2	14	3	2	Alkanesulfonate monooxygenase
A0QR71 A0QR71 MYCS2	24	3	3	Uncharacterized protein
I7FLV2 I7FLV2 MYCS2	18	3	3	Acyl-CoA dehydrogenase
A0R2K2 A0R2K2 MYCS2	11	4	4	Xylosidase/arabinosidase
A0QWZ3 A0QWZ3 MYCS2	25	4	4	Regulatory protein DeoR
A0QZ10 A0QZ10 MYCS2	40	2	2	Uncharacterized protein
A0QPP9 A0QPP9 MYCS2	11	4	4	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
A0QXH8 A0QXH8 MYCS2	17	4	4	Zinc-binding alcohol dehydrogenase
A0R1W1 A0R1W1 MYCS2	7	2	2	Putative neutral zinc metalloproteinase
A0QWC9 A0QWC9 MYCS2	31	4	4	Uncharacterized protein
A0QRL0 A0QRL0 MYCS2	11	2	2	Formyl-coenzyme A transferase
A0QRB1 A0QRB1 MYCS2	7	2	2	Amino acid carrier protein
A0R672 A0R672 MYCS2	32	2	2	Uncharacterized protein
A0QTP7 A0QTP7 MYCS2	33	1	1	Transcriptional regulator WhiB
A0R7H7 A0R7H7 MYCS2	27	2	2	Uncharacterized protein
A0R608 A0R608 MYCS2	22	2	1	Transcription regulator FurA
sp A0R2D3 RSEA MYCS2	61	3	3	Anti-sigma-E factor RseA
A0QSB7 A0QSB7 MYCS2	18	2	2	Uncharacterized protein
A0R4N3 A0R4N3 MYCS2	5	2	2	Virulence factor mce family protein
A0QRL1 A0QRL1 MYCS2	10	2	2	Carnitiny-CoA dehydratase
A0QX76 A0QX76 MYCS2	9	3	3	L-aspartate oxidase
sp A0R3Q8 RNH MYCS2	21	3	3	Ribonuclease H
A0QX14 A0QX14 MYCS2	16	2	2	Oxidoreductase
A0QNQ3 A0QNQ3 MYCS2	18	2	2	Transcriptional regulator GntR family protein
A0R6K3 A0R6K3 MYCS2	16	1	1	Uncharacterized protein
A0R2Y7 A0R2Y7 MYCS2	32	2	2	Uncharacterized protein
I7GCI3 I7GCI3 MYCS2	17	3	3	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
sp A0R2D4 SIGE MYCS2	10	2	2	ECF RNA polymerase sigma factor SigE
A0R1S1 A0R1S1 MYCS2	10	2	2	Peptidase M24 family protein
A0R1K3 A0R1K3 MYCS2	9	1	1	Uncharacterized protein
A0R7F2 A0R7F2 MYCS2	35	2	2	Transposase
sp A0QTT1 WHIB7 MYCS2	50	3	3	Transcriptional regulator WhiB7
A0QXS2 A0QXS2 MYCS2	13	2	2	Uncharacterized protein
A0QXM6 A0QXM6 MYCS2	12	2	2	Metal-dependent phosphohydrolase HD subdomain
A0R0F6 A0R0F6 MYCS2	41	2	2	Putative regulatory protein FmdB family protein
A0QT85 A0QT85 MYCS2	6	1	1	Norsolorinic acid reductase
I7G1U8 I7G1U8 MYCS2	27	2	2	MerR-family transcriptional regulator
sp A0QQ48 ECCE3 MYCS2	5	1	1	ESX-3 secretion system protein EccE3

Номер Uniprot	Покрытие (%)	Пептиды	Уникальные пептиды	Продукт
A0QY69 A0QY69 MYCS2	9	2	2	N5 N10-methylene-tetrahydromethanopterin reductase
A0QS38 A0QS38 MYCS2	7	2	2	Flavohemoprotein putative
A0QRL4 A0QRL4 MYCS2	3	1	1	5-oxovalerate dehydrogenase
A0R324 A0R324 MYCS2	8	2	2	Uncharacterized protein
A0R721 A0R721 MYCS2	18	1	1	Uncharacterized protein
I7FFR2 I7FFR2 MYCS2	6	1	1	Uncharacterized protein
A0R1B7 A0R1B7 MYCS2	10	2	2	HNH endonuclease family protein
A0QQJ1 A0QQJ1 MYCS2	7	1	1	Acetyltransferase
sp A0QX66 BIOD MYCS2	6	1	1	ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD
A0R2L6 A0R2L6 MYCS2	4	1	1	Sensor histidine kinase
A0R646 A0R646 MYCS2	2	1	1	Transcriptional regulator
A0QXU5 A0QXU5 MYCS2	3	1	1	O-acyl transferase
A0QTY1 A0QTY1 MYCS2	4	1	1	Sugar phosphate isomerase/epimerase
A0QRG7 A0QRG7 MYCS2	17	1	1	Uncharacterized protein
A0R0A4 A0R0A4 MYCS2	20	2	2	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase
A0QNO4 A0QNO4 MYCS2	8	2	2	Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme
A0QTK0 A0QTK0 MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein
A0QYM1 A0QYM1 MYCS2	9	2	2	Catalase-related peroxidase
A0QS75 A0QS75 MYCS2	10	1	1	DeoR-family protein transcriptional regulator
A0QZI8 A0QZI8 MYCS2	16	2	2	Nitroreductase
A0QXQ9 A0QXQ9 MYCS2	4	1	1	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F
A0R5S4 A0R5S4 MYCS2	4	1	1	Caib/baif family protein
sp A0QZU2 HOA1 MYCS2	4	1	1	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase 1
A0R2P5 A0R2P5 MYCS2	5	1	1	Tetracycline-resistance determinant TetV
A0R3X2 A0R3X2 MYCS2	7	1	1	Luciferase
A0R1V5 A0R1V5 MYCS2	4	2	2	Cytochrome P450
A0R3Z6 A0R3Z6 MYCS2	5	1	1	Transcriptional regulator LuxR family protein
A0QTJ9 A0QTJ9 MYCS2	12	1	1	ESAT-6-like protein
sp A0QZE3 Y3995 MYCS2	3	1	1	Putative hydrolase MSMEG_3995/MSMEI_3903
A0QSM6 A0QSM6 MYCS2	7	1	1	Antibiotic biosynthesis monooxygenase
A0QRC2 A0QRC2 MYCS2	4	1	1	Phosphate transporter
I7FNV4 I7FNV4 MYCS2	6	1	1	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein
A0QY68 A0QY68 MYCS2	2	1	1	Dihydropyrimidinase
A0QNI3 A0QNI3 MYCS2	8	1	1	ISMsm2 transposase
A0R513 A0R513 MYCS2	2	1	1	Major facilitator superfamily protein MFS_1
A0QTU4 A0QTU4 MYCS2	5	1	1	TetR-family protein transcriptional regulator
A0QZT5 A0QZT5 MYCS2	13	1	1	Uncharacterized protein
A0QR32 A0QR32 MYCS2	5	1	1	Cytochrome P450
A0R5N2 A0R5N2 MYCS2	12	2	2	Uncharacterized protein
A0R3P1 A0R3P1 MYCS2	33	1	1	Transcriptional regulator HTH_3 family protein
A0QYY2 A0QYY2 MYCS2	2	1	1	Glutamine synthetase
sp A0QU33 NUOD MYCS2	2	1	1	NADH-quinone oxidoreductase subunit D
sp A0QQ38 ECCA3 MYCS2	1	1	1	ESX-3 secretion system protein EccA3
I7FF76 I7FF76 MYCS2	6	1	1	Uncharacterized protein
A0QTH2 A0QTH2 MYCS2	18	1	1	Rubredoxin
A0R053 A0R053 MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein
A0QST0 A0QST0 MYCS2	2	1	1	Uncharacterized protein
A0QXW3 A0QXW3 MYCS2	5	1	1	Two-component system response regulator
A0R737 A0R737 MYCS2	1	1	1	Mycocerotic acid synthase
A0QPQ3 A0QPQ3 MYCS2	3	1	1	Uncharacterized protein
sp A0QYL8 MFSEP MYCS2	2	1	1	MFS-type efflux pump MSMEG_3705
A0QR96 A0QR96 MYCS2	2	1	1	Uncharacterized protein
A0QYC9 A0QYC9 MYCS2	6	1	1	Uncharacterized protein
I7G7F7 I7G7F7 MYCS2	10	1	1	Uncharacterized protein
A0R5W3 A0R5W3_MYCS2	4	1	1	ABC transporter quaternary amine uptake transporter (QAT) family protein substrate-binding protein

Таблица У.2 – Белки обнаруженные в протеоме только контрольного штамма *M. smegmatis* (msm_pMV261_E)

Номер Uniprot	Покрытие (%)	Пептиды	Уникальные пептиды	Продукт
I7FY62 I7FY62_MYCS2	72	23	23	Amidino transferase
A0QT14 A0QT14_MYCS2	66	22	22	Adenosine deaminase
A0QQH2 A0QQH2_MYCS2	96	13	13	Uncharacterized protein
A0R451 A0R451_MYCS2	55	29	29	DNA or RNA helicase of superfamily protein II
A0QT16 A0QT16_MYCS2	58	17	17	Aspartate ammonia-lyase
I7GDH3 I7GDH3_MYCS2	43	11	11	L-threonine aldolase
I7FHW4 I7FHW4_MYCS2	45	12	12	Putative Soj/para-related protein
I7G3E1 I7G3E1_MYCS2	51	13	13	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase (PAPS reductase)/FAD synthetase
A0R2Z9 A0R2Z9_MYCS2	30	11	11	Acyl-CoA synthase
I7FN52 I7FN52_MYCS2	38	13	13	ABC transporter ATP-binding protein
A0QYC3 A0QYC3_MYCS2	14	6	6	Acetyl-CoA acetyltransferase
I7F9V3 I7F9V3_MYCS2	63	8	8	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase
A0QNY0 A0QNY0_MYCS2	30	4	4	IS1096 tnpR protein
I7GDX8 I7GDX8_MYCS2	62	3	3	Uncharacterized protein
I7FK56 I7FK56_MYCS2	9	3	3	Radical SAM
I7G2S0 I7G2S0_MYCS2	14	2	2	Transcriptional regulator XRE family
I7FI13 I7FI13_MYCS2	12	3	3	2OG-Fe(II) oxygenase
I7FLG3 I7FLG3_MYCS2	23	2	2	HNH endonuclease
I7G147 I7G147_MYCS2	25	4	4	Transcriptional regulator HxIR family
A0QXI2 A0QXI2_MYCS2	34	2	2	Acyl carrier protein
A0QRC5 A0QRC5_MYCS2	22	2	2	Uncharacterized protein
A0QW9 A0QW9_MYCS2	12	3	3	MaoC like domain protein
I7FTD7 I7FTD7_MYCS2	16	3	3	Two component system response transcriptional positive regulator phoP
A0QTV1 A0QTV1_MYCS2	9	3	3	Amidohydrolase 2
I7G1G7 I7G1G7_MYCS2	2	1	1	Glutamate synthase large subunit
A0R2D6 A0R2D6_MYCS2	9	1	1	Probable transcriptional regulatory protein
A0QW10 A0QW10_MYCS2	2	1	1	Carbon-monoxide dehydrogenase
I7G8J7 I7G8J7_MYCS2	5	1	1	tRNA/tRNA methyltransferase (SpoU)
I7GA54 I7GA54_MYCS2	4	1	1	Peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase
I7GD29 I7GD29_MYCS2	11	2	2	Erythromycin esterase
A0R2P7 A0R2P7_MYCS2	4	1	1	Oxidoreductase
A0R1W5 A0R1W5_MYCS2	18	1	1	Uncharacterized protein
A0QXA2 A0QXA2_MYCS2	5	2	1	Glutamate synthase NADH/nadph small subunit
I7G3W1 I7G3W1_MYCS2	9	3	3	Macrolide glycosyltransferase
A0R3X3 A0R3X3_MYCS2	2	1	1	Rieske [2Fe-2S] domain protein
I7FJD6 I7FJD6_MYCS2	11	1	1	Uncharacterized protein
I7FXW4 I7FXW4_MYCS2	7	1	1	Putative allantoinase (Allantoate amidohydrolase)
A0QQB6 A0QQB6_MYCS2	10	2	2	Integral membrane protein
A0QVI0 A0QVI0_MYCS2	6	1	1	Acetyltransferase
I7FVT5 I7FVT5_MYCS2	10	1	1	Transcriptional regulator HxIR family
sp A0R756 LERI_MYCS2	13	2	2	L-erythrulose-1-phosphate isomerase
A0R077 A0R077_MYCS2	3	2	2	Amidohydrolase
I7FZJ3 I7FZJ3_MYCS2	5	1	1	Acyl-CoA dehydrogenase
A0QUN4 A0QUN4_MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein
I7G6R3 I7G6R3_MYCS2	17	1	1	Muconolactone Delta-isomerase
sp A0R666 ETHR_MYCS2	6	1	1	HTH-type transcriptional regulator EthR
I7FT63 I7FT63_MYCS2	10	1	1	Thioredoxin ThiX
A0R3D0 A0R3D0_MYCS2	8	1	1	LpqT protein
A0R402 A0R402_MYCS2	7	2	2	Transcriptional regulator LysR family protein
I7GA80 I7GA80_MYCS2	4	1	1	2-keto-3-deoxy-galactonokinase (2-dehydro-3-deoxygalactonokinase)
sp A0QWU7 MFS55_MYCS2	2	1	1	Probable triacylglyceride transporter
I7GGM5 I7GGM5_MYCS2	4	2	2	Glutamine synthetase catalytic domain putative
I7G4V9 I7G4V9_MYCS2	7	1	1	Cobalamin biosynthesis protein CobD
A0QTT8 A0QTT8_MYCS2	7	1	1	Uncharacterized protein
A0QNW9 A0QNW9_MYCS2	4	1	1	BadF/BadG/BcrA/BcrD ATPase family protein
A0R2K6 A0R2K6_MYCS2	10	1	1	CTP pyrophosphohydrolase
A0QTB7 A0QTB7_MYCS2	17	1	1	Uncharacterized protein
I7G5D1 I7G5D1_MYCS2	2	2	2	Putative ATP-dependent DNA helicase (UvrD/REP)
A0QZ39 A0QZ39_MYCS2	6	2	2	Sec-independent protein translocase protein TatC
A0QS94 A0QS94_MYCS2	8	1	1	LprB protein
A0R532 A0R532_MYCS2	5	1	1	Cation ABC transporter ATP-binding protein putative
A0QZW5 A0QZW5_MYCS2	13	1	1	MaoC family protein
I7FME6 I7FME6_MYCS2	3	1	1	Purine catabolism PurC domain protein
I7FNW3 I7FNW3_MYCS2	4	1	1	Amino acid permease-associated region
A0QST3 A0QST3_MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein

Номер Uniprot	Покрытие (%)	Пептиды	Уникальные пептиды	Продукт
I7G232 I7G232 MYCS2	6	1	1	Putative transcriptional regulatory protein TetR
A0QWB1 A0QWB1 MYCS2	8	1	1	Acyl-CoA dehydrogenase
A0R1F7 A0R1F7 MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein
A0QQ85 A0QQ85 MYCS2	2	1	1	FAD dependent oxidoreductase
A0R3A8 A0R3A8 MYCS2	12	1	1	Transcriptional regulator ArsR family protein
A0R5H8 A0R5H8 MYCS2	2	1	1	Gaba permease
A0R2M4 A0R2M4 MYCS2	2	1	1	Na ⁺ /solute symporter
sp A0QS29 RECB MYCS2	2	2	2	RecBCD enzyme subunit RecB
I7G6Z8 I7G6Z8 MYCS2	11	1	1	Transcriptional regulator TetR family
A0R5X2 A0R5X2 MYCS2	14	1	1	Transcriptional regulator
I7G9B3 I7G9B3 MYCS2	3	1	1	Transcriptional regulator IclR family
A0R228 A0R228 MYCS2	8	1	1	Uncharacterized protein
A0QRM8 A0QRM8 MYCS2	5	1	1	Cadmium inducible protein cadi
A0QRZ4 A0QRZ4 MYCS2	4	1	1	FAD binding domain in molybdopterin dehydrogenase protein
I7GFJ0 I7GFJ0 MYCS2	6	1	1	Transcriptional regulator PadR-like protein
A0QZW7 A0QZW7 MYCS2	10	1	1	Transcriptional regulator ArsR family protein
I7G867 I7G867 MYCS2	4	2	2	Succinate semialdehyde dehydrogenase
I7G019 I7G019 MYCS2	3	1	1	Hydrogenase expression/formation protein hypE
A0R1B9 A0R1B9 MYCS2	2	1	1	Alpha-amylase family protein
sp A0QRX9 PHD MYCS2	12	1	1	Antitoxin Phd
I7G371 I7G371 MYCS2	7	1	1	Alcohol dehydrogenase GroES-like protein
A0R715 A0R715 MYCS2	5	1	1	Transcriptional regulator GntR family protein
A0QR41 A0QR41 MYCS2	10	1	1	Uncharacterized protein
A0R700 A0R700 MYCS2	8	1	1	DNA-binding protein
A0QYZ0 A0QYZ0 MYCS2	5	1	1	Integral membrane protein
A0QRA3 A0QRA3 MYCS2	21	1	1	Uncharacterized protein
A0R3Y9 A0R3Y9 MYCS2	5	1	1	Uncharacterized protein
A0QS16 A0QS16 MYCS2	7	1	1	Transporter small conductance mechanosensitive ion channel (MscS) family protein
A0R0C6 A0R0C6 MYCS2	2	1	1	Tetratricopeptide repeat family protein
I7FUW8 I7FUW8 MYCS2	7	1	1	Uncharacterized protein
A0QW52 A0QW52 MYCS2	9	1	1	Uncharacterized protein
A0R2R5 A0R2R5 MYCS2	4	1	1	Uncharacterized protein
A0R1P6 A0R1P6 MYCS2	3	1	1	Alcohol dehydrogenase zinc-binding
A0QT77 A0QT77 MYCS2	2	1	1	Fatty acid desaturase
A0R3P8 A0R3P8 MYCS2	3	1	1	Uncharacterized protein
I7FI03 I7FI03 MYCS2	3	1	1	Uncharacterized protein
A0QZ44 A0QZ44 MYCS2	6	1	1	Uncharacterized protein
I7GAI3 I7GAI3 MYCS2	3	1	1	Photosystem I assembly BtpA
I7FU34 I7FU34 MYCS2	4	1	1	Phosphoglycerate mutase
A0R2P8 A0R2P8 MYCS2	6	1	1	TetR-family protein transcriptional regulator
I7FYG9 I7FYG9 MYCS2	1	1	1	Kojibiose phosphorylase
I7FYG6 I7FYG6 MYCS2	9	1	1	Uncharacterized protein
A0R275 A0R275 MYCS2	12	1	1	Uncharacterized protein
I7FRQ1 I7FRQ1 MYCS2	8	1	1	Transcriptional regulator HxIR family
A0QYV5 A0QYV5 MYCS2	11	1	1	Uncharacterized protein
A0R6B3 A0R6B3 MYCS2	10	1	1	Uncharacterized protein
A0R1Z8 A0R1Z8 MYCS2	6	1	1	Uncharacterized protein
A0QYK3 A0QYK3 MYCS2	9	1	1	Uncharacterized protein
I7G668 I7G668 MYCS2	2	1	1	Luciferase-like protein
I7FW29 I7FW29 MYCS2	2	1	1	Acyl-CoA dehydrogenase
A0R4D9 A0R4D9 MYCS2	3	1	1	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase
I7FRL5 I7FRL5 MYCS2	2	1	1	IS629 transposase orfB
A0QZW2 A0QZW2 MYCS2	2	1	1	Ribose transport ATP-binding protein RbsA

Приложение Ф

Различия в секретах штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией MTS1338 и штамма с контрольным вектором

Таблица Ф.1 – Белки, обнаруженных в секрете только штамма *M. smegmatis* с гетерологичной транскрипцией MTS1338 (msm_pMV261_1338)

Номер Uniprot	Уникальные пептиды	Продукт	Ген	<i>M. tuberculosis</i> ортолог	Функциональная категория
A0QY05	7	SGNH_hydro domain-containing protein	MSMEG_3489	Rv0518	Cell wall and cell processes
A0QV35	3,7	Putative D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB2 (Penicillin-binding protein)	MSMEG_2433	Rv2911	Cell wall and cell processes
A0QRU0	3	Uncharacterized protein	MSMEG_1237	no	
A0R773	2,7	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	MSMEG_6804	no	
A0QQ67	2,7	GH16 domain-containing protein	MSMEG_0645	no	
A0R639	2,3	Septum_form domain-containing protein	MSMEG_6414	Rv3835	Cell wall and cell processes
A0R445	2,3	Secreted protein	MSMEG_5700	Rv0867c	Cell wall and cell processes
A0QQY6	2,3	Uncharacterized protein	MSMEG_0921	Rv0477	Cell wall and cell processes
A0QP20	2,3	MHB domain-containing protein	MSMEG_0243	no	
A0QNK4	2,3	Antigen MTB48 ESX-1 secreted protein B PE domain	MSMEG_0076	Rv3881c	Cell wall and cell processes

Таблица Ф.2 – Белки обнаруженные в секрете только контрольного штамма *M. smegmatis* (msm_pMV261_E)

Номер Uniprot	Уникальные пептиды	Продукт	Ген	<i>M. tuberculosis</i> ортолог	Функциональная категория
I7G354	5,0	Secreted antigen 85-C FbpC	MSMEG_3580	Rv0129c	Lipid metabolism
A0QR29	3,3	Porin MspA	MSMEG_0965	no	
A0QRM0	3	UPF0234 protein	MSMEG_1165	Rv0566c	Conserved hypotheticals
A0R4A7	3	DUF732 domain-containing protein	MSMEG_5766	no	
A0QV51	2,7	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	MSMEG_2449	no	
A0R061	2,3	HesB/YadR/YfhF family protein	MSMEG_4272	Rv2204c	Conserved hypotheticals

Приложение X

Подтверждение результатов протеомного профилирования *M. smegmatis* на транскриптомном уровне

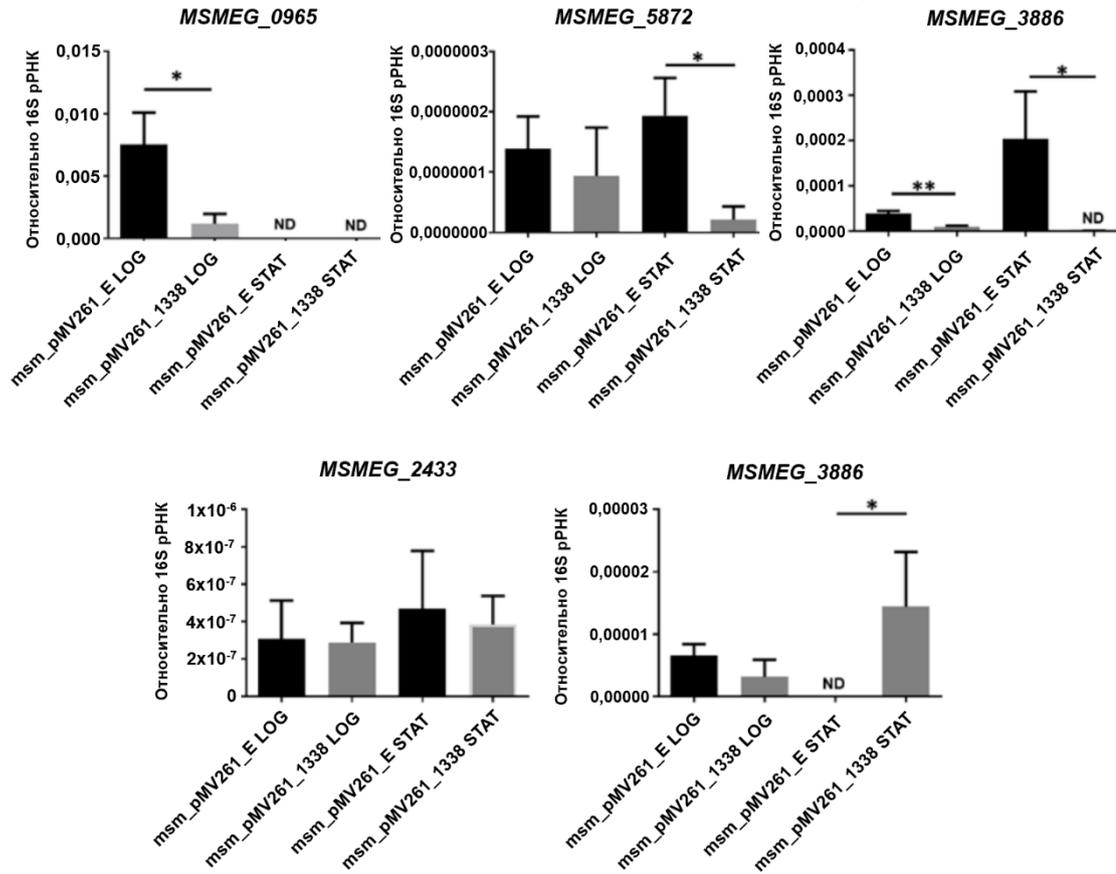


Рисунок X.1 – Подтверждение результатов протеомного профилирования *M. smegmatis* на транскриптомном уровне с помощью метода количественной ОТ-ПЦР в двух фазах роста *M. smegmatis*: логарифмической (LOG) и стационарной (STAT); * $p < 0,05$, ND – транскрипция не детектирована