

На правах рукописи

Григоров Артем Сергеевич

**РОЛЬ МАЛЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК МИКОБАКТЕРИЙ В  
АДАПТАЦИИ К СТРЕССАМ**

1.5.3 - Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2023



## Общая характеристика работы

### Актуальность 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. 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 малых некодирующих РНК<sup>1</sup>.

Традиционно внимание исследователей сосредоточено на изучении некодирующего транскриптома патогенных микобактерий, в частности, *M.*

---

<sup>1</sup> 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

*tuberculosis*. Однако нельзя недооценивать значения изучения нкРНК 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.

**Цель исследования:** Изучение роли малых некодирующих РНК микобактерий в ответе на различные стрессы на примерах *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis*.

### **Задачи исследования**

1. Характеризация транскриптомного ответа *M. smegmatis* в условиях холодового 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 исследования**

- Впервые подробно проанализированы изменения транскриптома *M. smegmatis* при холодовом 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 реусцитации 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 бактерий потенциальных факторов вирулентности.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

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 нкРНК 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 нкРНК 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.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of Science.

### **Список сокращений**

5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; КОЕ – колониеобразующие единицы; МИ – множественность инфекции; IFN- $\gamma$  – интерферон гамма; IL – интерлейкин; L-NIL – N6-(1-иминоэтил)-L-лизина гидрохлорид; Log<sub>2</sub>FC – логарифм отношения экспрессий с основанием 2, или Log<sub>2</sub> Fold Change; МТВ – *Mycobacterium tuberculosis*; Мф – макрофаги; P<sub>adj</sub> – скорректированное р-значение; TPM – нормализованные значения транскриптов на 1 миллион прочтений (Transcripts per million); WT – дикий тип (Wild type).

## Основное содержание работы

### 1. Полнотранскриптомное исследование *M. smegmatis* в условиях холодого стресса

Низкие температуры (или холодого стресс) представляют собой глобальный фактор, к которому приходится адаптироваться как непатогенным, так и патогенным микроорганизмам. Этот стресс приводит к изменению текучести мембраны, замедлению скорости всех биохимических реакций, стимуляции образования вторичных структур РНК и другим эффектам, к которым у живых организмов выработан широкий набор адаптаций (Zhang et al., 2021). Реакция на уровне некодирующего транскриптома в ответ на низкие температуры у бактерий практически не изучена, и известны единичные случаи регуляторных РНК, которые участвуют в адаптации к холодого стрессу.

Для поиска некодирующих РНК, которые могут участвовать в адаптации к низким температурам у *M. smegmatis*, сначала была проанализирована кривая роста данной бактерии при 15 °С. Резкое охлаждение температуры окружающей среды приводит к временной остановке пролиферации *M. smegmatis*: первый статистически значимый прирост оптической плотности культуры наблюдается через 24 часа после начала воздействия холодого стресса. На основе полученных данных для проведения профилирования транскриптома были выбраны временные точки, соответствующие условиям до воздействия стресса (нулевая точка времени, Н0), акклимационной фазе адаптации (2 и 5 часов, Н2 и Н5 соответственно) и полностью адаптированному состоянию (24 часа, Н24).

Анализ главных компонент данных транскриптомного секвенирования выявил наличие трех ярко выраженных кластеров, соответствующих основным стадиям адаптации (Рис.1).



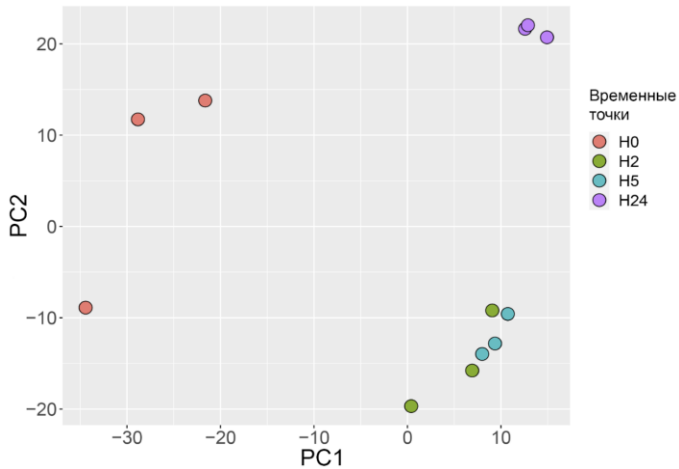


Рисунок 1 – Диаграмма двух главных компонент данных РНК-секвенирования проб *M. smegmatis*, инкубированных в условиях низких температур различное время

Анализ дифференциально экспрессированных генов выявил чрезвычайно динамичный характер изменения транскриптома: за первые два часа воздействия стресса меняется экспрессия более чем в 2 раза почти полутора тысяч белок-кодирующих генов, что составляет примерно четверть от всех генов *M. smegmatis*; из них 616 генов повышают свою экспрессию. Функциональный анализ данных секвенирования выявил изменение экспрессии ряда важных групп генов, среди которых можно выделить гены РНК-шаперонов, осмопротекторов, транскрипционных регуляторов, транспортеров, а также генов, которые принимают участие в процессах трансляции и модуляции состава клеточной стенки и мембраны.

Для выявления генов малых нкРНК было дополнительно проведено секвенирование фракции коротких РНК (до 300 нуклеотидов). Аннотацию границ генов потенциальных нкРНК проводили с использованием программы Rockhopper (McClure et al., 2013). Было обнаружено 43 цис-кодируемых и 13 транс-кодируемых нкРНК, из которых ранее было описано только 5.

Для выявления зависимости в экспрессии между цис-кодируемыми РНК и их потенциальными мРНК мишенями, гены которых расположены на противоположной цепи ДНК от нкРНК генов, был проведен корреляционный анализ экспрессии в динамике эксперимента. Результаты показали наличие негативной корреляции как минимум средней силы ( $r < -0.5$ ) между пятью парами нкРНК-мРНК, на Рисунке 2 представлены

графики транскрипции во времени двух из них. Негативная регуляция этих генов в акклимационной фазе адаптации к холодовому стрессу может быть связана со стратегией сохранения энергии для выживания в неблагоприятных условиях.

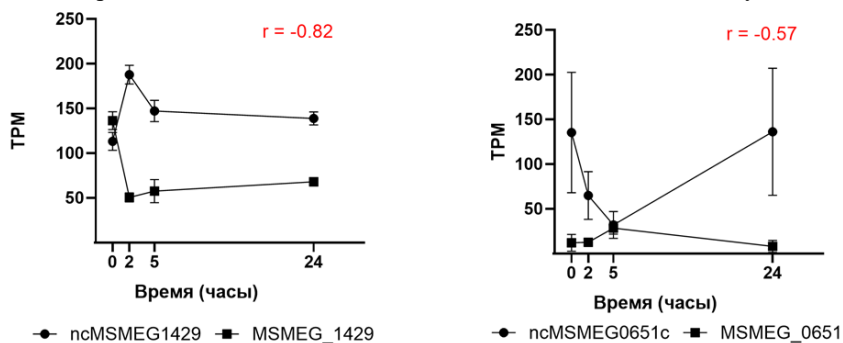


Рисунок 2 – Изменение транскрипции во времени цис-кодируемых нкРНК ncMSMEG1429 и ncMSMEG0651 и их предполагаемых мРНК мишеней *MSMEG\_1429* и *MSMEG\_0651* соответственно; транскрипция отображена в нормализованных значениях TPM; в правом верхнем углу указан коэффициент корреляции ( $r$ )

Для поиска мишеней транс-кодируемых нкРНК был проведен биоинформатический анализ с помощью программы TargetRNA3 и предсказаны потенциальные мРНК, с которыми способны взаимодействовать идентифицированные нкРНК. Для выявленных мРНК-мишеней и соответствующих нкРНК также был проведен корреляционный анализ, пары с негативным коэффициентом регуляции как минимум средней силы ( $r < -0.5$ ) представлены на Рисунке 3. В подавляющем большинстве случаев, в парах мРНК-нкРНК с корреляционной зависимостью наблюдается снижение экспрессии целевого гена и повышение экспрессии соответствующей малой РНК в течение первых часов действия низких температур. Предсказанные мишени включают в себя мРНК генов, продукты которых участвуют в метаболизме аминокислот, являются транспортерами, транскрипционными регуляторами и белками ремоделинга клеточной мембраны. Транскриптомный анализ показал, что в этих процессах происходят глобальные изменения при адаптации бактерии к низким температурам.

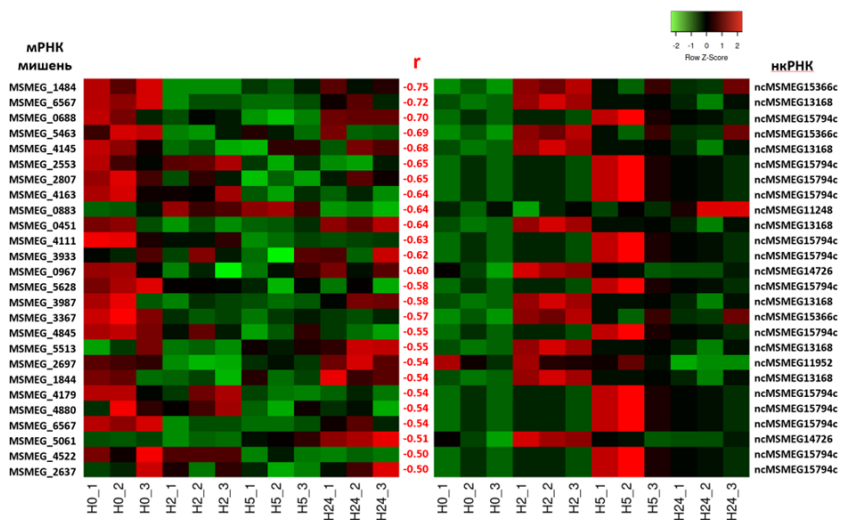


Рисунок 3 – «Тепловые» карты, представляющие изменение экспрессии в динамике холодового стресса выявленных транс-кодируемых нкРНК и их мРНК мишеней с коэффициентом корреляции  $r$  меньше  $-0,5$ ; цветом обозначены нормализованные значения экспрессии (Z-score); коэффициенты корреляций для каждой пары мРНК-нкРНК расположены в центральной колонке; представлены результаты секвенирования трех независимых биологических репликатов для каждой временной точки

Единственной из обнаруженных транс-кодируемых нкРНК, для которой была ранее показана функция в *M. smegmatis*, является Ms1 (ncMSMEG16173). Эта нкРНК активно транскрибируется в стационарной фазе роста, взаимодействует с кором РНК-полимеразы (Hnilicová et al., 2014), конкурируя с сигма-факторами, а также участвует в транскрипции  $\beta$  и  $\beta'$  субъединиц РНК-полимеразы, тем самым контролируя транскрипционную активность клетки (Šiková et al., 2019). Нами показано, что транскрипция Ms1 возрастает к 24 часам инкубации при низких температурах (Рис. 4), что подчеркивает схожесть процессов адаптации *M. smegmatis* к холодовому стрессу и к стационарной фазе.

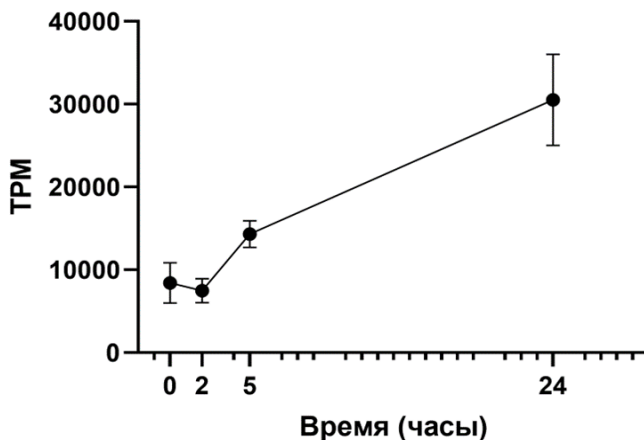


Рисунок 4 – Транскрипция малой некодирующей РНК MsI в динамике холодного стресса; транскрипция отобразена в нормализованных значениях TRM

## 2. Роль малой нкРНК F6 в переходе *M. smegmatis* в состояние покоя

Кислотный стресс представляет собой еще один важный негативный фактор окружающей среды, с которым сталкиваются микобактерии. F6 — это малая некодирующая РНК микобактерий, которая предположительно участвует в адаптации к кислотным условиям (Arnvig et al., 2009). Данная нкРНК консервативна и присутствует как у патогенных, так и непатогенных видов микобактерий.

Для изучения функции малой нкРНК F6 был получен мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией соответствующего гена. Мутагенез был выполнен с использованием метода замены аллеля при помощи генно-инженерной конструкции p2NIL/pGOAL19 (Parish и Stoker, 2000).

Созданный штамм ( $\Delta F6$ ) не отличался по скорости роста от штамма дикого типа *M. smegmatis* (MSM\_WT), но проявлял бóльшую склонность к агрегации в ранней логарифмической фазе роста.

Транскриптомное профилирование штамма  $\Delta F6$  показало повышение экспрессии 15 генов по сравнению со штаммом дикого типа (Рис. 5). Среди них можно выделить ген фактора ресусцитации *MSMEG\_4640* и два кластера (*MSMEG\_0156-0162*, *MSMEG\_0149-MSMEG\_0152*), которые расположены в одном геномном локусе. Некоторые гены указанных кластеров участвуют в ответе на окислительный стресс. Нами было показано, что созданный штамм характеризуется повышенной выживаемостью в условиях окислительного стресса по сравнению со штаммом дикого типа.

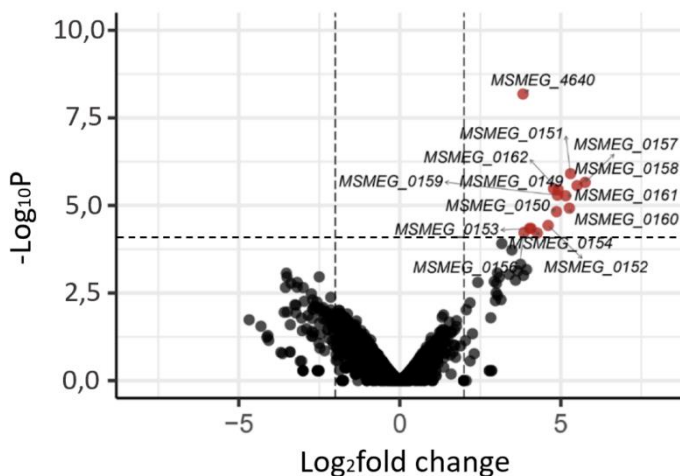


Рисунок 5 – Диаграмма Volcano, отображающая дифференциальную экспрессию генов в штамме *M. smegmatis*  $\Delta F6$  относительно штамма MSM\_WT. Статистически достоверно дифференциально экспрессированные гены ( $\text{Log}_2\text{FC} > 2,0$ ,  $\text{FDR} < 0,05$ ) выделены красным цветом

Проведенное нами биоинформатическое предсказание потенциальных мишеней F6 с помощью программы CopraRNA (Wright et al., 2014) показало, что одна из областей, которая способна образовывать РНК-РНК дуплекс с F6, расположена в 5'-нетранслируемой-области (5'-НТО) мРНК гена *MSMEG\_4640* (Рис. 6, А), повышение экспрессии которого отмечено в транскриптоме  $\Delta F6$ . Это взаимодействие было подтверждено с помощью репортерной системы, в которой перед геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) была расположена 5'НТО гена *MSMEG4640*: нарушение комплементарности в изучаемой последовательности с помощью мутаций приводило к усилению флуоресценции клеточного лизата (Рис 6, В; Рис 6, С). Внесение реципрокных мутаций приводило к снижению интенсивности флуоресценции до исходного уровня. Тем самым

доказано непосредственное взаимодействие F6 с её мишенью – мРНК гена *MSMEG\_4640 in vivo*.

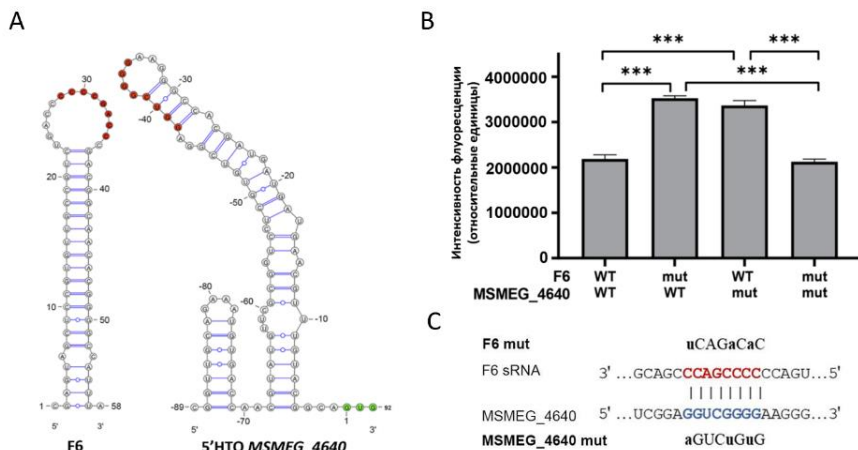


Рисунок 6 – Взаимодействие нкРНК F6 и 5'-НТО мРНК *MSMEG\_4640*; (А) Вторичные структуры F6 и 5'-НТО *MSMEG\_4640*; нуклеотиды предсказанной области взаимодействия выделены красным цветом; старт-кодон мРНК выделен зеленым цветом; (В) Гистограмма, представляющая результаты экспериментальной оценки взаимодействия F6 с 5'-НТО *MSMEG\_4640* с использованием различных вариантов репортерной конструкции; обозначение WT маркирует вариант интактной последовательности, mut – мутантный вариант; \*\*\*  $p < 0,001$ ; (С) Схематичное представление взаимодействия малой РНК F6 и 5'-НТО *MSMEG\_4640*; Введенные в последовательности точечные мутации выделены нижним регистром

На основании данных транскриптомного профилирования и экспериментов, доказывающих прямое взаимодействие нкРНК F6 и мРНК гена фактора ресусцитации *MSMEG\_4640*, было предположено, что делеция гена F6 может влиять на фенотип бактерии при переходе в некультивируемое состояние. Культивирование бактерий в модели покоя с ограниченным содержанием ионов калия (Shleeва et al., 2004) выявило, что у штамма *M. smegmatis*  $\Delta F6$  нарушена способность к переходу в некультивируемое состояние (Рис. 7, верхняя панель). Комплементация штамма с помощью плазмиды, содержащей ген F6, возвращает фенотип

дикого типа (в качестве контроля использовался штамм с вектором pMV306 без гена F6) (Рис. 7, нижняя панель).

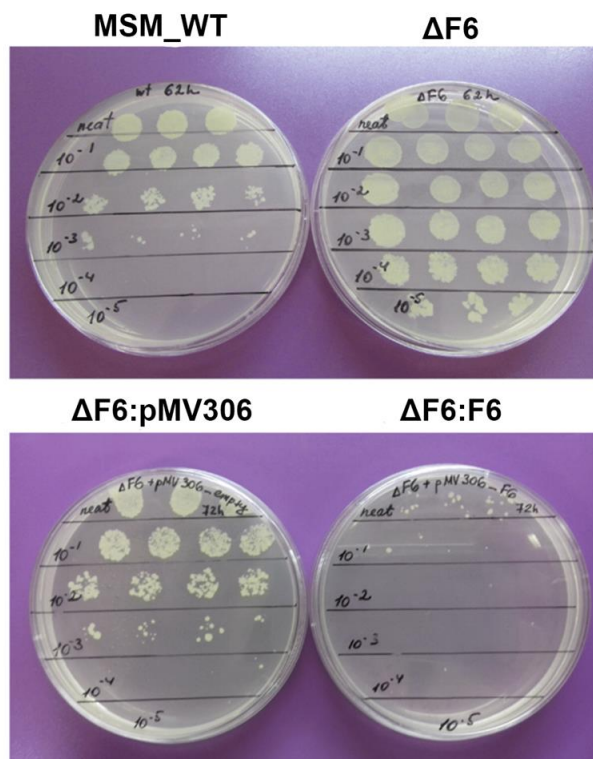


Рисунок 7 – Визуальная оценка роста штаммов MSM\_WT,  $\Delta F6$ ,  $\Delta F6:pMV306$  и  $\Delta F6:F6$  в различных разведениях на агаризованной питательной среде после культивации в жидкой среде с ограниченным содержанием ионов калия

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

Малые некодирующие РНК могут участвовать в адаптации патогенных бактерий к специфическим стрессам, связанным с иммунной системой макроорганизма. Одной из нкРНК *M. tuberculosis*, для которой была предложена подобная функция, является MTS1338, гомологи которой присутствуют только у патогенных видов микобактерий, входящих в туберкулезный комплекс (Arnvig et al., 2011). Ранее отмечалась активная

транскрипция этой некодирующей РНК в стационарной фазе роста микобактерий и в мышинной модели инфекции *in vivo* (Amvig et al., 2011).

Изучение транскрипции MTS1338 при выходе *M. tuberculosis* из состояния покоя показало, что количество этой нкРНК остается на постоянном уровне в первые дни реактивации, а синтез *de novo* отсутствует.

Анализ динамики транскрипции MTS1338 в мышинной модели инфекции (линия мышей C57BL/6) выявил, что количество MTS1338 в легочной ткани резко возрастает к 10 неделе инфекции; к этому моменту животные развивают полноценный адаптивный иммунный ответ против микобактерий (Linge et al., 2023).

Изучение транскрипции MTS1338 при заражении перитонеальных макрофагов мыши в модели *ex vivo* показало, что количество этой нкРНК возрастает при активации макрофагов гамма-интерфероном (IFN- $\gamma$ ), одним из центральных компонентов адаптивного иммунного ответа (Рис. 8).

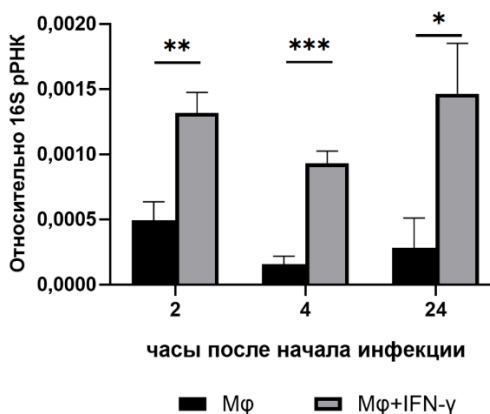


Рисунок 8 – Динамика транскрипции MTS1338 при заражении перитонеальных макрофагов мышей линии В6 при активации INF- $\gamma$  и без нее; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Ранее было показано, что ген MTS1338 находится под контролем транскрипционного фактора DosR (Moore et al., 2017), одного из центральных регуляторов *M. tuberculosis*. Активация DosR происходит в условиях гипоксии и под действием монооксида азота (NO). IFN- $\gamma$  индуцирует экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), отвечающей за продукцию NO во время инфекции. Нами предположено, что именно этот каскад приводит к повышению транскрипции MTS1338 в условиях инфекции *ex vivo*. Для проверки гипотезы был поставлен



эксперимент, в котором активированные IFN- $\gamma$  и зараженные *M. tuberculosis* макрофаги были обработаны селективным ингибитором iNOS L-NIL [N6-(1-иминоэтил)-L-лизина гидрохлорид]. Применение ингибитора привело к полному нивелированию эффекта IFN- $\gamma$  на транскрипцию MTS1338 (Рис. 9). При этом, ингибитор не влияет на транскрипцию MTS1338 в бактериальной культуре *M. tuberculosis*.

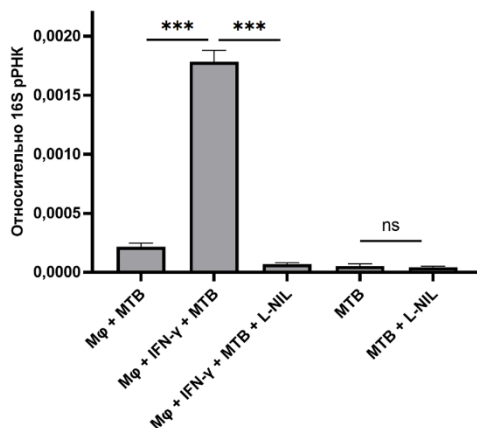


Рисунок 9 – Уровень транскрипции MTS1338 через 24 часа после инфекции: контроль (мф + МТВ), активация IFN- $\gamma$  (мф + МТВ + IFN- $\gamma$ ), активация IFN- $\gamma$  и обработка L-NIL (мф + МТВ + IFN- $\gamma$  + L-NIL), бактериальная культура без инфекции (МТВ) и бактериальная культура с обработкой L-NIL. \*\*\* $p < 0,001$ , ns – статистически значимой разницы не обнаружено

Чтобы изучить влияние MTS1338 на *M. tuberculosis*, был создан штамм *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией этой нкРНК (mtb\_pMV261\_1338) и проведен анализ устойчивости рекомбинантного штамма к некоторым макрофаг-подобным стрессам: окислительному (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), кислотному (pH 5.5) и нитрозативному (0.5 mM DETA NONOate). Выявлено, что штамм МТВ\_pMV261\_1338 выживает лучше в каждом из стрессов по сравнению с контрольным штаммом mtb\_pMV261\_E (содержал вектор pMV261 без гена MTS1338) как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста.

Для того, чтобы определить, на какие биохимические пути может влиять транскрипция MTS1338, было проведено транскриптомное профилирование штаммов МТВ\_pMV261\_1338 и МТВ\_pMV261\_E в условиях перечисленных выше стрессов, а также без стресса. В ходе анализа был идентифицировано 11 генов, меняющих свою экспрессию при гиперэкспрессии MTS1338 во всех изучаемых условиях; большая часть этих

генов кодируют транскрипционные факторы, функции которых связаны с широким спектром адаптаций.

В ходе работы нами было выявлено, что гетерологичная транскрипция MTS1338 в непатогенной бактерии *M. smegmatis* приводит к появлению у штамма ряда фенотипических проявлений, сходных с эффектами гиперэкспрессии этой нкРНК в *M. tuberculosis*. А именно, транскрипция MTS1338 замедляет скорость роста рекомбинантного штамма *msm\_pMV261\_1338 M. smegmatis* по сравнению с контрольным штаммом (*msm\_pMV261\_E*). Подобное ингибирование роста было впервые описано для *M. tuberculosis* (Ignatov et al., 2015).

При заражении созданными штаммами *M. smegmatis* культуры макрофагов мыши RAW264.7 было показано, что транскрипция MTS1338 приводит к повышению выживания рекомбинантного штамма (Рис. 10).

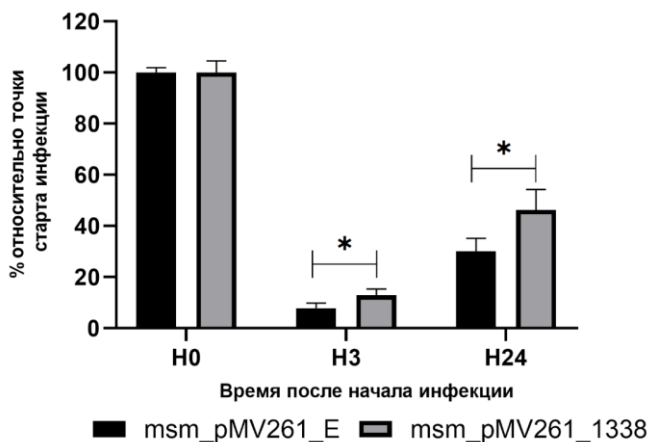


Рисунок 10 – Выживание экспрессирующего MTS1338 (*msm\_pMV261\_1338*) и контрольного (*msm\_pMV261\_E*) штаммов *M. smegmatis* при заражении макрофагов линии RAW264.7 (МИ 1:10); КОЕ в нулевой точке принято за 100%; \* $p < 0,05$

При заражении макрофагов RAW264.7 штаммами *M. smegmatis* *msm\_pMV261\_1338* и *msm\_pMV261\_E*, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок GFP, наблюдалось снижение процента колокализации микобактерий с маркером кислых компартментов эукариотических клеток LysoTracker и антителами к маркеру созревания фаголизосом LAMP-1 (Рис. 11).

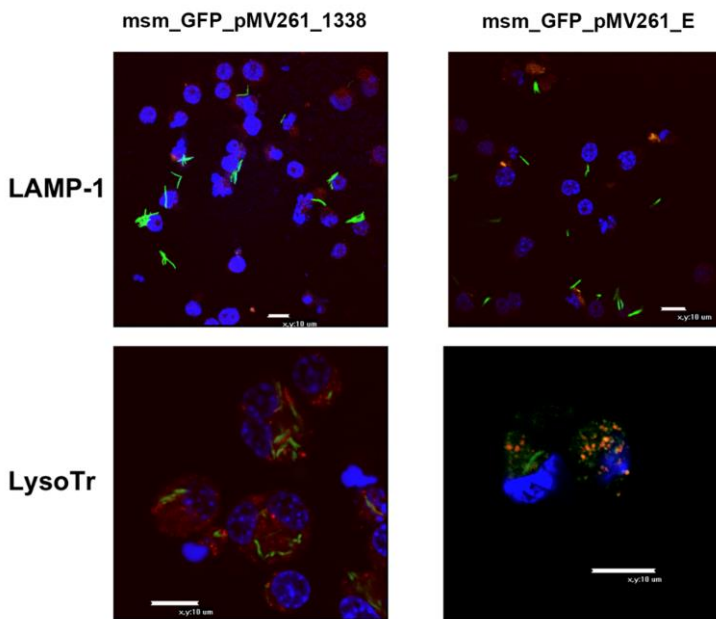


Рисунок 11 – Фотографии, полученные с помощью флюоресцентного микроскопа, демонстрирующие инфекцию макрофагов линии RAW 264.7 двумя штаммами *M. smegmatis*: транскрибирующим MTS1338 (*msm\_GFP\_pMV261\_1338*) и контрольным (*msm\_GFP\_pMV261\_E*); оба штамма экспрессируют GFP (зеленый цвет); ядра макрофагов окрашены голубым. LAMP-1 (верхняя панель) и LysoTracker (нижняя панель) окрашены красным цветом; колокализация микобактерий и LAMP-1/кислых компартментов окрашена оранжевым

Еще одним обнаруженным следствием гетерологичной транскрипции MTS1338 в *M. smegmatis* является изменение транскрипции ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при инфекции макрофагов штаммом *msm\_pMV261\_1338*. Было отмечено статистически значимое снижение транскрипции генов цитокинов IL-1 $\beta$ , IL10, IL12, TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Транскрипция *IL-6*, напротив, была повышена (Рис. 12).

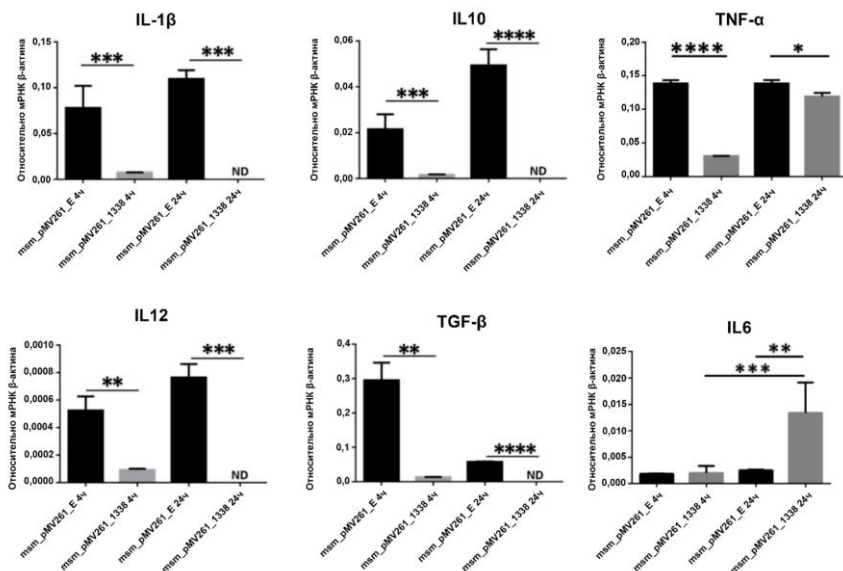


Рисунок 12 – Транскрипция цитокинов относительно бета-актина в макрофагах, инфицированных штаммом *M. smegmatis*, транскрибирующим MTS1338 (msm\_pMV261\_1338), и контрольным штаммом (msm\_pMV261\_E); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

Исследование изменений, происходящих с бактерией *M. smegmatis* при транскрипции MTS1338, проведенное на уровне протеома и секретома, выявило, что в штамме msm\_pMV261\_1338 в логарифмической фазе роста происходит повышение экспрессии нескольких белков, гомологи которых у *M. tuberculosis* являются факторами вирулентности: D-аланил-D-аланин карбоксипептидазы DacB2, фактора ресусцитации A0R455, липазы A0QY05 и антигена MTB48.

## Заключение

Результаты, полученные в ходе экспериментов на *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, свидетельствуют о важной роли некодирующих РНК микобактерий в адаптации к стрессам. В частности, было показано, что существует набор некодирующих РНК *M. smegmatis*, которые меняют свою экспрессию в условиях низких температур, и выявлены их потенциальные мишени. Для малой некодирующей РНК *M. smegmatis* F6 была продемонстрирована её роль в переходе микобактерии в некультивируемое состояние и участие в адаптации к окислительному стрессу. Для другой некодирующей РНК, MTS1338, которая характерна только для микобактерий туберкулезного комплекса, был показан существенный вклад в устойчивость микобактерий к различным стрессам как при ее гиперэкспрессии в *M. tuberculosis*, так и при гетерологичной транскрипции в модели *M. smegmatis*.

## 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 работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Grigorov A.S.**, Skvortsova Y.V., Bychenko O.S., Aseev L.V., Koledinskaya L.S., Boni I.V., Azhikina, T.L. Dynamic Transcriptional Landscape of *Mycobacterium smegmatis* under Cold Stress // International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 16, P. 12706.
2. Martini B.A., **Grigorov A.S.**, Skvortsova Y.V., Bychenko O.S., Salina E.G., Azhikina T.L. Small RNA MTS1338 Configures a Stress Resistance Signature in *Mycobacterium tuberculosis* // International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 9, P. 7928.
3. **Grigorov A.**, Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Mazurova A., Skvortsov T., Kaprelyants A., Azhikina T. Small RNA F6 Provides *Mycobacterium smegmatis* Entry into Dormancy // International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, No. 21, P. 11536.
4. Bychenko O., Skvortsova Y., Ziganshin R., **Grigorov A.**, Aseev L., Ostrik A., Kaprelyants A., Salina E.G., Azhikina T. *Mycobacterium tuberculosis* Small RNA MTS1338 Confers Pathogenic Properties to Non-Pathogenic *Mycobacterium smegmatis* // Microorganisms, 2021, Vol. 9, No. 2, P. 414.
5. Salina E.G., **Grigorov A.**, Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., Ostrik A., Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, Vol. 9, P. 405.
6. Salina E.G., **Grigorov A.S.**, Bychenko O.S., Skvortsova Y.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Resuscitation of Dormant “Non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, Vol. 9.

Публикации в сборниках и тезисы конференций:

1. **A. Grigоров**, I. Boni, T. Azhikina. CspA of *Mycobacterium tuberculosis*: autoregulation and expression at low temperatures // Сборник тезисов EMBO Workshop on Tuberculosis 2022 «From innovation to intervention», 2022, с. 108.

2. **Григоров А.С.**, Салина Е.Г., Быченко О.С., Скворцова Ю.В., Острик А.А., Свирщевская Е.В., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л. Малые некодирующие РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 и MTS0997 модулируют иммунный ответ при инфекции макрофагов // Спецвыпуск ActaNaturae, 2021, Т. 2., с. 13.

3. Быченко О.С., Скворцова Ю.В., **Григоров А.С.**, Асеев Л.В., Острик А.А., Салина Е.Г., Ажикина Т.Л. Малая РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 как фактор вирулентности микобактерий // Спецвыпуск ActaNaturae, 2021, Т. 2., с. 23.

4. **Григоров А.С.**, Салина Е.Г., Быченко О.С., Скворцова Ю.В., Майоров К.Б., Апт А.С., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л. Малые некодирующие РНК *Mycobacterium tuberculosis* как регуляторы взаимодействия «патоген–хозяин» // Спецвыпуск ActaNaturae, 2019, Т. 2., с. 9.

5. Скворцова Ю.В., Быченко О.С., Зиганшин Р.Х., **Григоров А.С.**, Салина Е.Г., Острик А.А., Ажикина Т.Л. Малая РНК MTS1338 *Mycobacterium tuberculosis* способствует выживанию микобактерий в макрофагах путем замедления созревания фаголизосом // Спецвыпуск ActaNaturae, 2019, Т. 2., с. 26.

6. **Grigоров A.**, Salina E.G., Bychenko O., Skvortsova Y., Kaprelyants A., Azhikina T. Resuscitation of dormant ‘non-culturable’ *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst // Сборник тезисов EMBO | EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology, 2019, с. 176.

7. **Grigоров A.**, Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Kaprelyants A., Azhikina T. Small RNA F6 modulates *Mycobacterium smegmatis* entry into dormancy // Сборник тезисов EMBO | EMBL Symposium: The Non-coding Genome, 2019, с. 187.

8. **Grigоров A.**, Salina E.G., Skvortsova Y., Bychenko O., Kaprelyants A., Azhikina T. DrrS and Mcr11, small RNAs of *Mycobacterium tuberculosis*, are involved in bacterial adaptation to persistence in the host organism // Сборник тезисов FEBS Open Bio, 2019, с. 246.

9. **Григоров А.С.**, Салина Е.Г., Быченко О.С., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л. Роль DrrS, малой некодирующей РНК *Mycobacterium tuberculosis*, в адаптации к макрофагальному стрессу // Спецвыпуск Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2019, Т. 37, с. 55.