

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

©2021 г. А. А. ОСТРИК¹, Т. Л. АЖИКИНА²,
Е. Г. САЛИНА¹

¹ *Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

² *Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Регуляторные механизмы, реализуемые малыми некодирующими РНК. III. Подходы к обнаружению малых РНК у *M. tuberculosis*. IV. Малые РНК *M. tuberculosis* с установленным механизмом действия. V. Особенности взаимодействия «патоген-хозяин», осуществляемые посредством малых РНК. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Туберкулёз (ТБ) является чрезвычайно распространённой инфекцией в мире, уносящей около двух миллионов человеческих жизней на планете ежегодно. Кроме того, каждый год регистрируется свыше восьми миллионов новых случаев инфицирования [1]. Возбудитель инфекции бактерия *Mycobacterium tuberculosis* способна длительно сохраняться в организме, обуславливая латентную инфекцию, которая впоследствии может реактивироваться в условиях снижения иммунного статуса [2]. Механизмы, позволяющие *M. tuberculosis* избегать факторов иммунной защиты организма хозяина, длительно сохранять жизнеспособность в условиях стрессового воздействия при внутриклеточном персистировании и переходить из покоящегося

Принятые сокращения: нетранслируемая область – НТО; сайт взаимодействия с мишенью – seed region; сайт посадки рибосомы – RBS; секвенирование РНК – RNA-seq; туберкулёз – ТБ.

Адрес для корреспонденции: elenasalina@yandex.ru

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект №18-15-00332)

состояния в активное, являются предметом тщательного изучения современных иммунологов, бактериологов, молекулярных биологов.

Попадая в организм человека, клетки *M. tuberculosis* вступают во взаимодействие с клетками иммунной системы, причем следует отметить, что микобактерии туберкулеза вызывают в макроорганизме ответ, отличный от такового при других бактериальных инфекциях. Микобактерии модулируют или перепрограммируют созревание фагосом, используя компоненты клеточной стенки и секретируемые продукты, этот процесс известен как «остановка созревания фагосом». В макрофагах, которые первыми из иммунных клеток взаимодействуют с *M. tuberculosis*, микобактерии способны подавлять аутофагию и передачу межклеточного сигнала, и противостоять воздействию токсичных веществ, таких как активные радикалы кислорода, оксид азота и металлы [3, 4], что приводит к сохранению жизнеспособности микобактерий внутри макрофагов. Таким образом, *M. tuberculosis* используют макрофаги в качестве основной ниши для длительной персистенции в организме [5–8].

Длительное сосуществование *M. tuberculosis* и его хозяина позволило патогену выработать набор стратегий, позволяющих эффективно бороться с системами иммунной защиты. Среди них – некодирующие РНК, которые в совокупности со своими мишенями составляют сложные регуляторные сети, позволяющие патогену адаптировать свой метаболизм на различных стадиях развития инфекции [9]. На сегодняшний момент установлено, что малые некодирующие РНК, являющиеся наиболее многочисленной группой регуляторных РНК, играют важнейшую роль в приспособлении *M. tuberculosis* к паразитическому образу жизни [9].

Малые некодирующие РНК подразделяются на цис-кодируемые и транс-кодируемые антисмысловые РНК [10]. Цис-кодируемые антисмысловые РНК кодируются в одном локусе со своей мРНК мишенью, но на противоположной цепи ДНК, что приводит к их комплементарному связыванию. В большинстве случаев цис-кодируемые малые РНК блокируют трансляцию за счет комплементарного связывания с сайтом посадки рибосомы на мРНК мишени. Транс-кодируемые антисмысловые РНК представляют особый интерес: они закодированы как отдельные гены, то есть имеют собственный промотор и терминатор, расположены в участках генома, удаленных от местоположения регулируемого гена, их размер варьирует от 50 до 300 нуклеотидов. Часто гены малых РНК локализируются между белок-кодирующими генами. Малые РНК обладают стабильной вторичной структурой, что предотвращает их быструю деградацию,

а также делает возможным формирование петель с неспаренными основаниями, образующими сайт взаимодействия с мишенью (т.н. seed region). Ранее в обзоре Ажикиной и соавторов [10] была подробно охарактеризована роль малых антисмысловых РНК (цис-кодируемых и транс-кодируемых) в метаболизме бактерий. Недавно опубликован обзор, посвященный поиску и регуляции малых РНК микобактерий [11]. В нашем обзоре мы подробно остановимся на регуляторной роли транс-кодируемых малых РНК у одного их опаснейших патогенов – *M. tuberculosis*.

II. РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ МАЛЫМИ НЕКОДИРУЮЩИМИ РНК

Малые транс-кодируемые РНК (далее – малые РНК) обнаруживают лишь частичную комплементарность с мишенями и, следовательно, могут иметь более одной мишени. Действие их на мишень может реализовываться двумя путями: через непосредственное РНК–РНК взаимодействие или через связь с белком-посредником (Hfq или ProQ) [9–12].

Взаимодействие может приводить к прекращению трансляции мРНК за счёт блокировки сайта связывания рибосомы, и этот механизм является самым распространённым для малых РНК [9]. Связывание малой РНК с мишенью не только препятствует посадке рибосомы, но и во многих случаях инициирует расщепление РНК–РНК дуплекса РНКазами типов J и E. В случае полицистронной мРНК связывание с малой РНК в её 5'-области может привести к Rho-зависимой терминации трансляции на всех участках мРНК [13].

В других случаях малые РНК могут, наоборот, активировать трансляцию белка. 5'-нетранслируемая область (НТО) некоторых мРНК может образовывать шпильку, закрывающую сайт посадки рибосомы. Взаимодействие петли малой РНК с комплементарной цепью мРНК раскрывает такую шпильку, обеспечивая инициацию трансляции [14]. Кроме того, малые РНК могут стабилизировать другие транскрипты. Связывание малой РНК с сайтом рестрикции мРНК-мишени препятствует расщеплению матрицы, при этом увеличивается время полужизни транскриптов [15]. Другим примером активации служит предотвращение внутренней Rho-зависимой терминации в длинной 5'-нетранслируемой области некоторых генов [16].

Среди малых РНК выделен отдельный функциональный класс – РНК-спонжи (sponge RNAs). В этот класс входят малые РНК, которые связываются с другими малыми РНК и регулируют их активность.

РНК-спонжи обнаружены у энтеробактерий и *B. subtilis* в ходе изучения РНК-РНК взаимодействий. Разнообразие происхождения РНК-спонжей и биологических процессов, в которых они участвуют, свидетельствует о распространённости этого механизма регуляции у бактерий. РНК-спонжи, как и другие малые РНК, могут быть закодированы в отдельном гене, но также могут образовываться из 3' или 5'-концов, или спейсерных участков других генов. РНК-спонж имеет участок комплементарности с другой малой РНК - её мишенью. Формирование дуплекса приводит к секвестрации малой РНК или деградации комплекса. Интенсивность ингибирования варьируется концентрацией малой РНК либо РНК-спонжа, которые, в свою очередь зависят от условий экспрессии. Подробное описание механизмов работы РНК-спонжей приведено в обзоре [17].

Также найдены малые некодирующие РНК с «двойной функцией»: в этом случае РНК является регулятором, и в то же время матрицей для небольших пептидов. В гене таких малых РНК имеется открытая рамка считывания. К примеру, хорошо изученная малая РНК RNAIII *S. aureus* контролирует экспрессию нескольких генов патогенности, действуя по классическому механизму малой РНК: она связывается с мРНК-мишенями за счёт наличия seed region в одной из петель вторичной структуры. Кроме этого, RNAIII кодирует белок δ-гемоллизин, повреждающий мембраны клеток организма-хозяина [18].

Таким образом, малые некодирующие РНК представляют собой мощнейший регуляторный резервуар для адапционного ответа на быстро меняющиеся внешние условия. Поиск и идентификация их функции у *M. tuberculosis* являются крайне важными для понимания их роли в развитии туберкулезной инфекции и взаимодействии с макроорганизмом.

III. ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ МАЛЫХ РНК У *M. TUBERCULOSIS*

К настоящему моменту у *M. tuberculosis* обнаружено около 2000 некодирующих регуляторных РНК, относящихся к различным функциональным классам, к малым транс-кодируемым РНК отнесено примерно 560 из них. Экспериментально при помощи гибридизации по Нозерну или анализа на микрочипах было подтверждено свыше 20 малых транс-кодируемых РНК *M. tuberculosis*, при этом только 8 малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* на сегодняшний момент охарактеризованы достаточно подробно.

Некоторые малые некодирующие РНК, обнаруженные у бактерии *M. tuberculosis*, встречаются у всех представителей рода *Mycobacterium*.

bacterium, например, малая РНК B11 (MTS2822), другие, такие как, например, Mcr11 (MTS0997) и DrrS (MTS1338), обнаружены только у патогенных микобактерий. Следует отметить, что у *M. tuberculosis* не обнаружены гомологи белков-шаперонов Hfq и ProQ, опосредующих взаимодействие малых РНК с мРНК-мишенями [9]. Тем не менее, предполагается, что в клетках *M. tuberculosis* все-таки может существовать некий белок, опосредующий работу малых РНК. Кандидатами на эту роль являются, в частности, РНК-связывающие белки CspA и CspB из обширного семейства белков холодового шока [9, 19].

Безусловно, задача обнаружения малых некодирующих РНК привлекает пристальное внимание исследователей. Так, еще в 2006 году с помощью компьютерной программы *sRNAPredict2* в геноме *M. tuberculosis* было предсказано 56 некодирующих РНК [20]. Поиск основывался на сравнительном анализе последовательностей в межгенных участках у разных видов бактерий, учитывалась гомология и характерные черты малых РНК, однако тогда существование обнаруженных таким способом малых РНК не было подтверждено экспериментально. Поскольку на тот момент времени было обнаружено не так много бактериальных малых регуляторных РНК, причем большинство из них было обнаружено в Грам-отрицательных организмах, значительно отличающихся от микобактерий, это существенно снижало вероятность обнаружения микобактериальных некодирующих РНК.

Следующий подход к обнаружению малых РНК *M. tuberculosis* был принят несколькими годами позднее [21] путём секвенирования кДНК библиотек низкомолекулярной фракции РНК (20–75 нт). Обнаруженные малые РНК были подтверждены при помощи Нозерн-блоттинга, а их точные границы определены методом RACE-анализа (rapid amplification of cDNA ends), всего было обнаружено 5 транскодируемых малых РНК: B11, B55, C8, F6 и G2. В это же время были предприняты первые попытки охарактеризовать физиологическое значение этих малых РНК. Так, C8 была отнесена к структурной РНК, гомологичной 4.5S РНК.

Позднее в клетках в *M. bovis BCG* были найдены 34 малые РНК [22]. В данной работе исследователи объединили два подхода: компьютерное предсказание на основе межвидовой гомологии и клонирование короткоцепочечных кДНК. Все найденные малые РНК были подтверждены с помощью Нозерн-блоттинга. Из 34 малых РНК 20 были также обнаружены у *M. tuberculosis*, и три из них, а именно F6, C8, B11, совпали с найденными в предыдущем исследовании [21].

В результате анализа транскриптома *M. tuberculosis* методом РНК-секвенирования (RNA-seq) [23] было обнаружено 15 малых неко-

дирующих РНК, 11 из них были подтверждены Нозерн-блоттингом, включая 5 ранее открытых малых РНК [21]. Кроме того, в этой работе авторы представили более детальную характеристику трёх малых РНК: MTS2823, MTS1338 и MTS0997 [23].

В дальнейшем был разработан новый алгоритм для предсказания некодирующих РНК [24], который включал комбинацию двух подходов: анализа данных РНК-секвенирования и данные о консервативности определённого участка генома, полученные методом сравнительной геномики. Применительно к *M. tuberculosis* (транскриптомные данные были получены для бактерий, находившихся в экспоненциальной фазе роста), с помощью данного алгоритма было предсказано 1948 некодирующих РНК, из них 977 отнесены к транс-кодируемым. В данный список вошли все обнаруженные ранее малые РНК. При введении дополнительных критериев (минимальное расстояние до близлежащего гена, минимальная свободная энергия вторичной структуры) список транс-кодируемых РНК-кандидатов сократился до 59. Анализ 1373 из предсказанных некодирующих РНК на микрочипах [25] подтвердил наличие 258 соответствующих транскриптов. 22 из них были отнесены к транс-кодируемому малому РНК и 4 из них, названные авторами #149, #161, #224 и #1096, были дополнительно подтверждены при помощи Нозерн-блоттинга.

В 2016 году был опробован еще один алгоритм поиска малых РНК у *M. tuberculosis* [26], основанный на тех же принципах: наличие консервативных высоко экспрессирующихся последовательностей в транскриптоме бактерии. Библиотеки кДНК для секвенирования в этом случае строились отдельно для разных фракций РНК, выделенных из культур в логарифмической фазе роста. Алгоритм RNAz, использованный в эксперименте, включал несколько параметров поиска, среди них: консервативность нуклеотидов последовательности у представителей рода *Mycobacterium*, их консервативная структура и стабильность. Кроме малых РНК, найденных и подтверждённых в предыдущих исследованиях, было предложено 192 новые потенциальные малые РНК, 14 из них были выбраны для подтверждения с помощью Нозерн-блоттинга и 13 дали положительный результат.

Недавно при анализе генома *M. tuberculosis* методом насыщенного транспозонного мутагенеза было найдено 62 потенциальные малые РНК из разных функциональных категорий, мутации в 7 из них приводили к нарушению скорости роста клеток [27]. Данный подход позволяет найти гены, необходимые для роста бактерий по частоте мутаций, индуцированных вставкой транспозона. Исследователи

разработали программу *BS_finder* для предсказания регуляторных малых РНК по данным РНК-секвенирования, которая сканирует транскриптом по принципу «скользящего окна» и находит небольшие транскрипты, полностью или частично закодированные в межгенной области, имеющие чёткие 5'- и 3'-границы и большую глубину прочтения по сравнению с соседними участками.

Следует подчеркнуть, что все использованные ранее методы поиска малых РНК основывались на анализе транскриптомов бактерий, выращенных при стандартных условиях в богатых питательных средах. При этом могли быть не выявлены многие малые РНК, участвующие в адаптации к стрессовым условиям, так как они экспрессировались в данных условиях на очень низком уровне. Геррик и соавторы провели поиск малых РНК с помощью программы *BS_finder* в транскриптомах бактерий, подвергавшихся воздействию различных стрессовых факторов [28]. Они обнаружили 189 потенциальных малых некодирующих РНК, 103 из которых не были детектированы ранее. Также авторы отмечают, что уровень экспрессии этих потенциальных малых РНК различался в зависимости от условий культивирования. Одна из малых РНК, MrsI, обнаруженная и подтвержденная впервые в этом исследовании, была детально проанализирована.

Идея анализа транскриптомов клеток *M. tuberculosis*, полученных при различных условиях культивирования, была позднее развита Ами и соавторами [29]. Авторы проанализировали депонированные в базах данные РНК-секвенирования *M. tuberculosis* в логарифмической фазе роста с использованием метода «скользящего окна». По результатам поиска было выделено 65 межгенных участков, относящихся к вероятным транс-кодируемым малым РНК (этот список включал и четыре малые РНК, экспериментально подтверждённые ранее: ncRv11147Ac, ncRv2395, ncRv11534A и MrsI). Экспрессия генов потенциальных малых РНК была изучена на основе метода анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанных на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и высокоэффективном секвенировании ДНК (ChIP-seq) с белком RNAP (РНК-полимераза) и белком NusA (входящем в состав транскрипционного комплекса и участвующем в терминации и анти-терминации транскрипции) в *M. tuberculosis* в различных условиях роста: логарифмическая и стационарная фаза, покой, реактивация и стрессовые воздействия (всего 15 состояний). Оказалось, что эти межгенные участки в значительной степени связывались с транскрипционными комплексами. Также была обнаружена дифференциальная экспрессия 24 из подтверждённых ранее малых РНК.

IV. МАЛЫЕ РНК *M. TUBERCULOSIS* С УСТАНОВЛЕННЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ

Несмотря на многочисленные попытки по изучению функциональной роли малых РНК *M. tuberculosis*, эти усилия на протяжении длительного времени имели весьма ограниченный успех. Однако последние годы ознаменовались целым рядом успешных исследований: на сегодняшний момент проведена функциональная характеристика для 8 малых РНК *M. tuberculosis*, и для 4 из них найдены мишени (рис. 1).

MCR7 (MTB000067)

Малая некодирующая РНК Mcr7 исходно была обнаружена в клетках *Mycobacterium bovis* BCG путем анализа библиотек кДНК и подтверждена при помощи Нозерн-блоттинга, после чего ее гомолог был найден в клетках *M. tuberculosis* [22]. Mcr7 – это первая малая РНК *M. tuberculosis*, для которой была установлена ее функция [30]. Экспрессия Mcr7 регулируется двухкомпонентной сигнальной системой PhoPR, которая играет важнейшую роль в вирулентности микобактерий и контролирует экспрессию примерно 2% всех генов *M. tuberculosis*, включая гены системы секреции ESX-1.

В свою очередь, малая РНК Mcr7, являясь мишенью белка PhoP, модулирует трансляцию гена *tatC*, связываясь с его мРНК (Рис. 1а), и влияет на активность секреторного комплекса Tat *M. tuberculosis*, компонентом которого является *tatC*. Комплекс Tat осуществляет секрецию белков со специфической сигнальной последовательностью, содержащей два остатка аргинина (twin-arginine мотив), в число которых входит иммунодоминантный комплекс Ag85 [31] и бета-лактамаза BlaC [32].

MRSI (MTB000142, NCRV11846)

В 2018 г. Геррик и соавторы опубликовали результаты исследования, посвященного поиску малых РНК, характерных для различных стрессовых состояний [28]. Бактерии подвергали воздействию одного из стрессовых факторов: 1) отсутствие железа в среде культивирования, 2) окислительный стресс, 3) повреждение мембран, 4) кислые значения pH среды, 5) недостаток питательных веществ. Секвенирование библиотек кДНК, полученных из соответствующих образцов РНК с последующим отбором транскриптов, с наибольшей вероятностью подходящих на роль малых РНК, и сравнение их уровня экспрессии с уровнем экспрессии в контрольном образце клеток выявило 82 потенциальных малых РНК, имеющих дифференциальную экспрессию

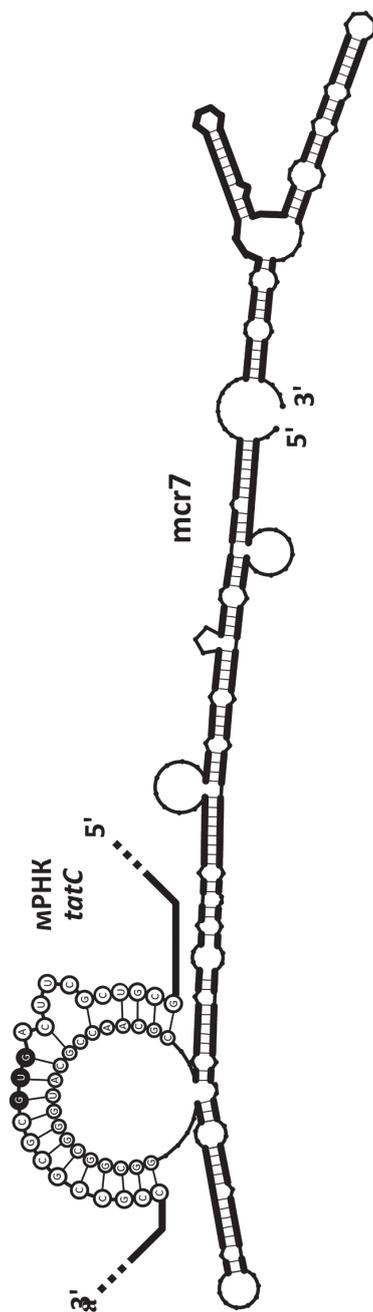


Рис. 1. Взаимодействие малых РНК *M. tuberculosis* с мРНК мишеней. Стартовые кодоны обозначены черными кружками.

а. Mcr7 связывается с RBS и первыми кодонами *tatC* и блокирует трансляцию.

б. MgsI взаимодействует с 5' НТО *bfrA* и препятствует трансляции.

в. B11 связывается с RBS *rapD* и ингибирует трансляцию.

г. F6 взаимодействует с 5' НТО *hrcA*, что приводит к раскрытию шпильки, закрывающей последовательность Шайна-Дальгарно, и инициации его трансляции. (см. рис на сл. стр. →)

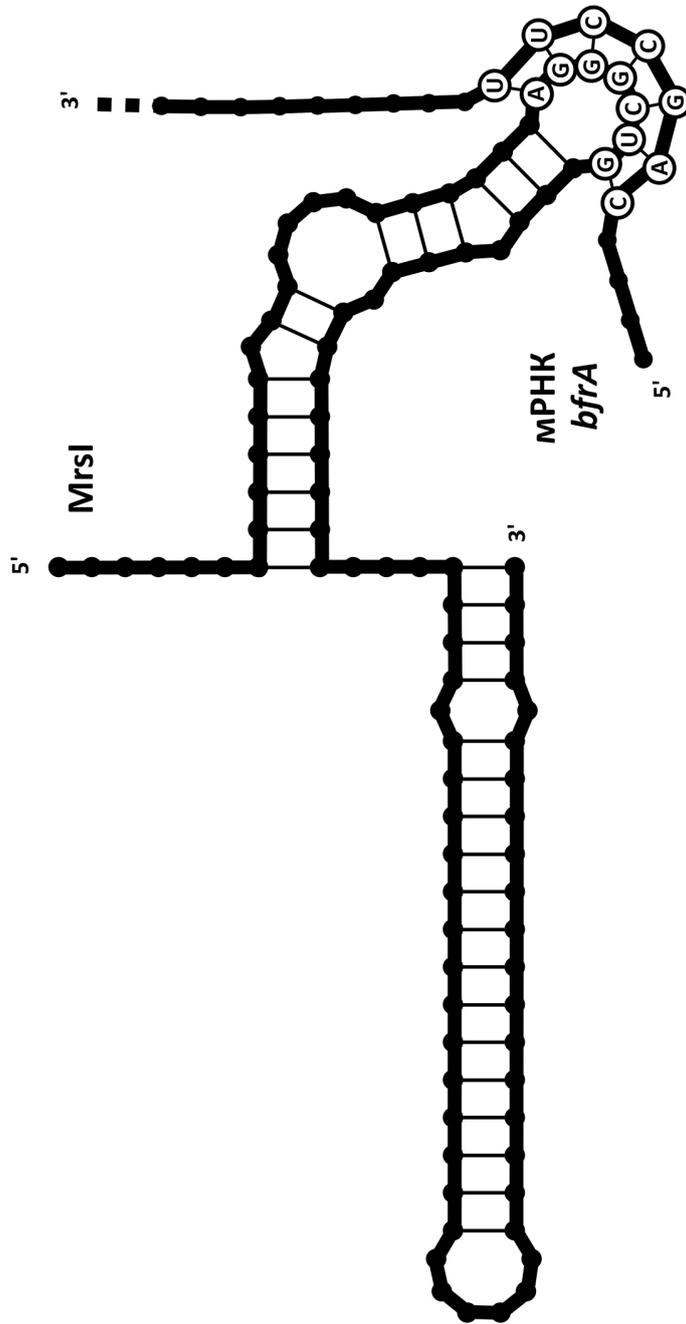


Рис. 16. Mrsl взаимодействует с 5' НТО *bfrA* и препятствует трансляции.

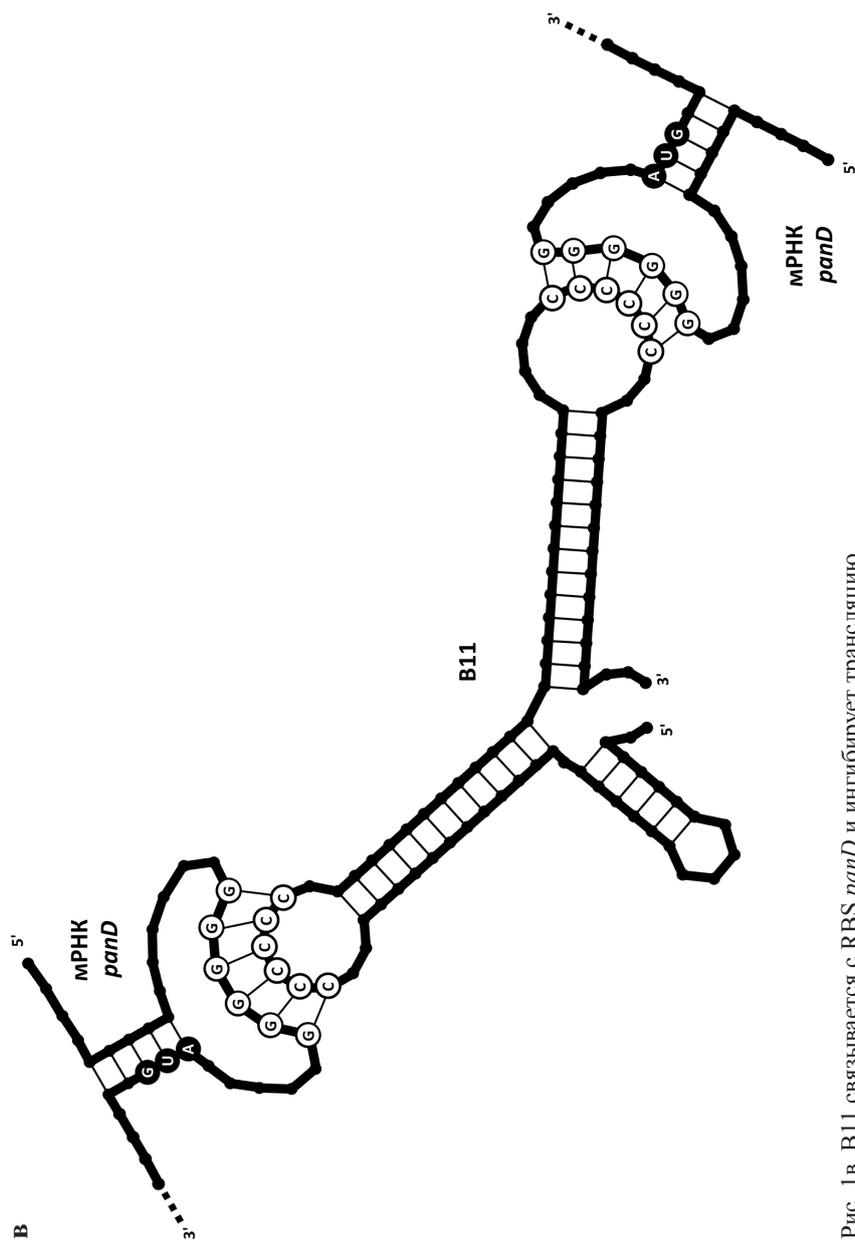


Рис. 1в. B11 связывается с RBS *ranD* и ингибирует трансляцию.

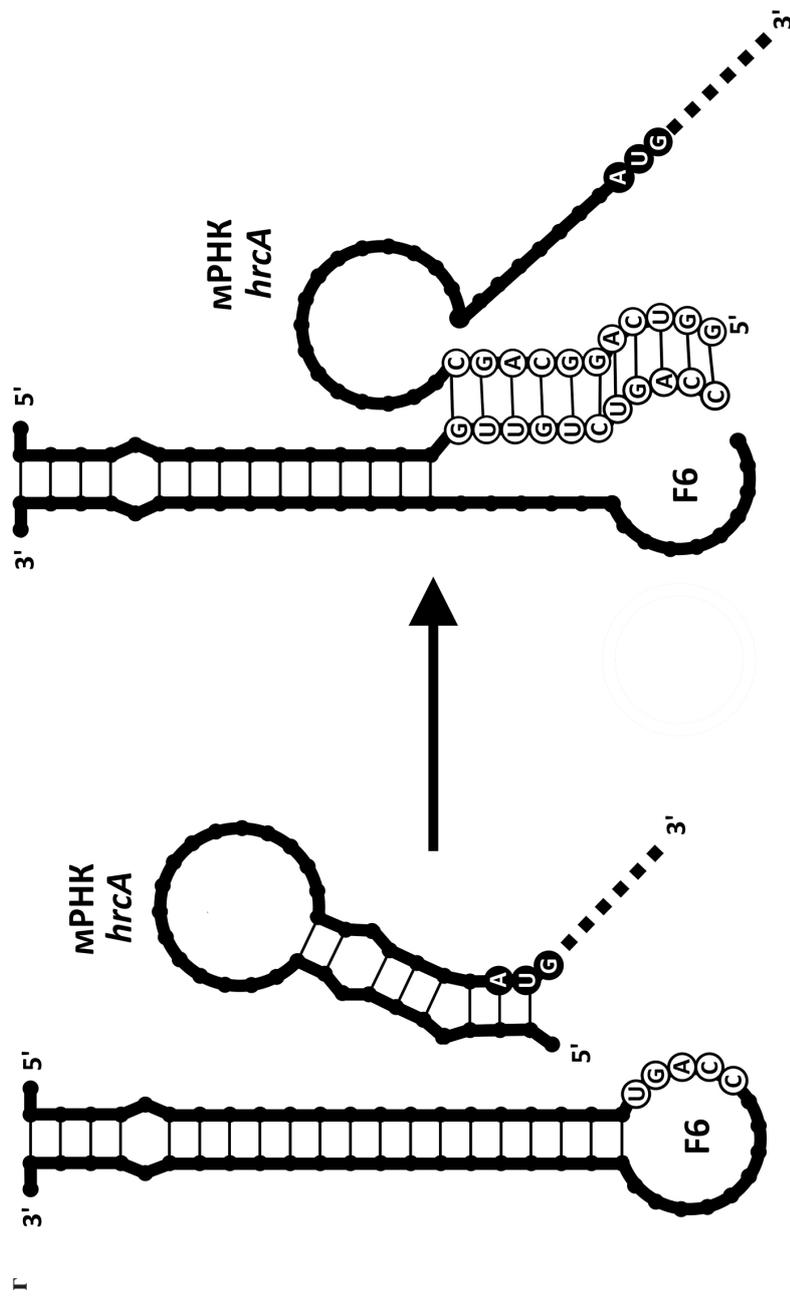


Рис. 1г. F6 взаимодействует с 5' НТО *hrcA*, что приводит к раскрытию шпильки, закрывающей последовательность Шайна-Дальгарно, и инициации его трансляции. Модифицировано из [38]

хотя бы в одном из этих стрессовых состояний. Малая РНК ncRv11846 характеризовалась наибольшим увеличением уровня экспрессии в условиях отсутствия железа в среде культивирования, а также высоко экспрессировалась при повреждении мембран. Её последовательность является консервативной для семейства *Mycobacteriaceae* и близкого ему семейства *Nocardiaceae*, а ее гомолог был ранее описан у *M. smegmatis* [33]. Она была выбрана авторами исследования для подробного изучения и в результате названа MrsI (*m*ycobacterial *r*egulatory *s*rRNA *i*n *i*ron) [28]. Для малой РНК MrsI была предсказана стабильная вторичная структура, а также вероятный сайт связывания, состоящий из 6 нуклеотидов в апикальной петле. Делеция гена малой РНК влияла на жизнеспособность бактерии только в условиях низкого содержания железа в среде. При протеомном и транскриптомном анализе такого штамма было обнаружено повышенное содержание железосвязывающих белков и их транскриптов. Биоинформатический анализ показал возможность взаимодействия найденных транскриптов с предполагаемым seed region. Одна из мишеней – мРНК гена *bfrA*, кодирующего белок бактериоферритин, участвующий в запасании железа (рис. 1б). На связь MrsI с регуляцией метаболизма железа указывало также обнаружение сайта связывания транскрипционного фактора IdeR, который активируется у микобактерий при дефиците железа [34]. Таким образом, малая РНК MrsI по своей функции оказалась аналогична малой РНК RyhB в *E. Coli* [35]. При понижении концентрации железа малая РНК MrsI подавляет трансляцию белков, способных связывать ионы железа, но не играющих роли для выживания бактерии, тем самым устанавливается более экономный расход железа в клетке.

B11 (NCRV13660C, MTS2822, 6C)

Малая РНК B11 содержит 6С-мотив в виде двух шпилек, содержащих по 6 последовательно расположенных остатков цитозина в петле, найдена Арнвиг и соавторами в 2009 г при скрининге кДНК библиотек низкомолекулярной фракции РНК *M. tuberculosis* [21]. Данная малая РНК очень консервативна среди бактерий рода *Mycobacterium*, ее гомологи обнаруживаются также у бактерий рода *Streptomyces* и *Corynebacterium*. Экспрессия B11 индуцируется в условиях окислительного стресса и сниженных значений pH среды [21]. Гиперэкспрессия данной малой РНК в клетках *M. tuberculosis* приводила к летальному фенотипу, а в клетках *M. smegmatis* – к замедлению скорости роста [21].

Малая РНК В11 имеет стабильную вторичную структуру, в которую входят три петли. Две из них содержат seed region, представляющий собой 6 или 7 идущих подряд цитозинов. Комплементарная этому участку последовательность гуанинов встречается в 5'-лидерной области многих генов микобактерий. Позднее было показано, что наличие обеих петель и сохранность цитозиновой последовательности в транскрипте малой РНК В11 является критической для реализации её функции [36]. Транскриптомный анализ выявил изменение (преимущественно понижение) экспрессии значительного количества генов, у мРНК 47 генов был обнаружен потенциальный сайт взаимодействия с малой РНК В11. Из этих 47 генов-кандидатов было выбрано 15 потенциальных мишеней (среди которых гены *panD*, *dnaB*, *espE*, *espF*, *eccA1*, *PE35*, *MTB84* и *тусP1*), для которых взаимодействие было экспериментально подтверждено. Во всех случаях повышение экспрессии малой РНК В11 в *M. smegmatis* приводило к ингибированию трансляции мРНК гена-мишени. Подавление трансляции гена *dnaB*, кодирующего репликативную ДНК-хеликазу, было определяющим для формирования характерного фенотипа гиперэкспрессии В11. Любопытно, что взаимодействие малой РНК В11 с мРНК-мишенью происходит напрямую (Рис. 1в), что было проверено при помощи EMSA-анализа и методом транспозонного мутагенеза [36].

Исследование функции малой РНК В11 было продолжено в клетках *Mycobacterium kansasii* [37]. Исследователями был получен штамм с мутацией в 5'-области гена малой РНК, которая привела к полному подавлению её экспрессии, но не затрагивала экспрессию соседних генов. Штамм *M. kansasii* с «выключенной» малой РНК В11 имел дефект роста на плотных питательных средах. Оказалось, что такие микобактерии не были способны к образованию биоплёнок, хотя их планктонный рост не отличался от роста штамма дикого типа. Несмотря на то, что молекулярные мишени в данном исследовании не были предложены, такая физиологическая характеристика расширяет спектр возможной регуляторной роли малой РНК В11.

F6 (NCRV10243, MTS194, MTB000051)

Малая РНК F6 была обнаружена путём секвенирования кДНК библиотек низкомолекулярной фракции РНК *M. tuberculosis* [21] и подтверждена Нозерн-блоттингом. Она найдена как у патогенных представителей рода *Mycobacterium*, так и у *M. smegmatis*. При попытке охарактеризовать её физиологическую роль было обнаружено повышение экспрессии F6 в условиях окислительного стресса, гипоксии, низких значений pH среды, при инфекции макрофагов,

но наиболее сильное повышение экспрессии отмечено в условиях ограничения поступления питательных веществ. [21, 38]. Обнаружено, что гиперэкспрессия малой РНК F6 отрицательно сказывалась на скорости роста клеток *M. tuberculosis* [21], при этом ни гиперэкспрессия, ни делеция гена малой РНК F6 не оказывала влияния на рост клеток *M. smegmatis* [21]. Делеция F6 в *M. tuberculosis* оказывала негативное влияние на выход *M. tuberculosis* из покоящегося состояния в модели гипоксии Вейна [38]. Анализ транскрипционного профиля штамма *M. tuberculosis* с делецией малой РНК F6 в условиях недостатка питательных веществ выявил повышение уровня экспрессии 4 генов: Rv0440 (*groEL2*), Rv3418c (*groES*), Rv0990c и Rv0991c. Все эти гены входят в один регулон и находятся под контролем транскрипционного репрессора HrcA (Rv2374c), который активируется при тепловом шоке. В 5'-области мРНК *hrcA* формируется шпилька, препятствующая трансляции этой матрицы, так как она частично закрывает последовательность Шайна-Дальгарно. На комплементарной цепи также имеется сайт связывания с малой РНК F6. При связывании F6 эта шпилька раскрывается, делая доступным сайт связывания с рибосомой и иницируя трансляцию (рис. 1г). Как следствие активации трансляции репрессора HrcA в клетке снижается продукция шаперонов GroEL/S.

MCR11 (MTS0997, MTB000063)

Малая РНК Mcr11 была впервые найдена в 2010 году в транскриптоме клеток *Mycobacterium bovis* BCG логарифмической фазы роста методом РНК-секвенирования (RNA-seq) и подтверждена при помощи Нозерн-блоттинга [22]. Ген малой РНК Mcr11 также присутствует у *M. tuberculosis*, и её экспрессия была подтверждена экспериментально, при этом у непатогенных микобактерий гомологи Mcr11 не были обнаружены.

Было установлено, что уровень экспрессии Mcr11 нарастает при переходе в стационарную фазу роста (как в *M. tuberculosis*, так и в *M. bovis*). Экспрессия Mcr11 заметно усиливается в модели инфекции мышей [23, 39] и в покоящемся состоянии *M. tuberculosis* [40]. Анализ профилей экспрессии показал повышение транскрипции малой РНК в клетках в условиях недостатка питательных веществ и понижение экспрессии при кислых значениях pH среды, а также обнаружил зависимость экспрессии от уровня цАМФ [41]. Гиперэкспрессия Mcr11 приводила к замедлению роста культуры клеток *M. tuberculosis* [40]. Было показано, что транскрипцию Mcr11 регулирует белок AbmR, закодированный в смежном с Mcr11 гене [42]. Промоторная область

белка AbmR (АТФ-binding *mcr11* regulator) и малой РНК Mcr11 частично перекрываются. AbmR обладает ауто-ингибирующей активностью, специфически связываясь со своей промоторной областью в присутствии АТФ. В штамме с делецией белка AbmR не наблюдалось изменений концентрации малой РНК, зависящих от фазы роста. Вероятно, экспрессия Mcr11 зависит от концентрации АТФ в клетке и регулируется АТФ-связывающим транскрипционным фактором AbmR [42]. С помощью программы для поиска мишеней TargetRNA было предсказано связывание малой РНК Mcr11 с мРНК генов *lipB* (кодирует липоат-протеин лигазу В, необходимую для биосинтеза липоата), Rv3282 (кодирует белок, вероятно участвующий в построении септы деления) и *fadA3* (кодирует β-кетоацил коэнзим А тиолазу) [43]. Поскольку ранее была показана связь этих генов с метаболизмом липидов, исследователи оценили рост штаммов *M. tuberculosis* и *M. bovis* BCG с делецией гена Mcr11 в условиях дефицита жирных кислот в среде культивирования. Оказалось, что рост мутантных штаммов в среде, где отсутствовали экзогенные источники олеата, был нарушен. При этом экспрессия предсказанных генов-мишеней повышалась в штаммах с делецией по сравнению с контрольным диким штаммом. Исследователи пришли к выводу о том, что малая РНК Mcr11 контролирует экспрессию трёх оперонов: 1) *dlaT*-Rv2216-*lipB*, 2) *accD5*-*accE5*-Rv3282 и 3) *fadA3*, но также может иметь и другие мишени, вовлечённые в регуляцию липидного обмена микобактерий [44].

MTS1338 (DRRS, MТВ000077)

Малая РНК MTS1338, так же как и Mcr11, присутствует только у патогенных микобактерий туберкулёзного комплекса и была найдена методом RNA-seq в полном транскриптом *M. tuberculosis* [23]. Экспрессия этой малой РНК возрастает по мере перехода бактерий в стационарную фазу роста [23]. MTS1338 регулируется генами DosR-регулона, экспрессия которых возрастает при переходе в стационарную фазу и при воздействии стрессовых условий. MTS1338 имеет стабильную вторичную структуру, время полужизни транскрипта составляет 6 ч [44]. Значительное накопление малой РНК происходит при инфекции (в мышинных моделях и при инфекции клеточной линии макрофагов) [23, 39, 45]. Концентрация малой РНК увеличивается в ответ на активацию макрофагов γ-интерфероном, через активацию макрофагальной NO-синтазы [45]. В покоящихся клетках *M. tuberculosis* концентрация малой РНК MTS1338 почти достигает уровня 16S рРНК [40]. Гиперэкспрессия приводит к замедлению роста

микобактерий [23, 40]. При этом штаммы с гиперэкспрессией характеризуются большей устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов, особенно возрастает резистентность таких бактерий к закислению среды [45, 46]. Транскриптомный анализ штамма с гиперэкспрессией MTS1338, выращенного при нормальных условиях, выявил изменение экспрессии ряда генов, характерное для клеток, находящихся в состоянии гипоксии и указывающих на снижение трансляционной активности клетки [45]. В целом, результаты проведённых исследований подтверждают роль малой РНК MTS1338 в патогенезе бактерии и приспособлении к жизни внутри инфицированного организма.

MTS2823 (MTV000078)

Данная малая РНК была впервые описана в 2011 году [23]. В стационарной фазе роста и в хронической фазе инфекции мышей концентрация данной малой РНК в клетках микобактерий очень высока и почти достигает уровня рибосомальных РНК. Высокий уровень экспрессии также обнаруживается в покоящемся состоянии [40] и при воздействии стрессов *in vitro* [29]. При гиперэкспрессии MTS2823 в *M. tuberculosis* сильно понижается экспрессия многих генов, кодирующих ферменты центрального метаболизма [23].

MTS2823 высококонсервативна среди бактерий рода *Mycobacterium* и найдена также у других представителей актинобактерий. Предсказанная вторичная структура малой РНК представляет собой двухцепочечную шпильку со «вздутием» в середине и двумя небольшими петлями на концах. Такая структура имитирует ДНК во время транскрипции и может связываться с РНК-полимеразой. Малая РНК 6S *E. coli* имеет такое же строение и выполняет роль ингибитора транскрипции. MTS2823 является функциональным аналогом 6S, хотя и имеет некоторые отличия. Механизм действия малой РНК был изучен у *M. smegmatis*, имеющий её гомолог Ms1 [47]. Ms1 связывается с РНК-полимеразой (RNAP) до её связывания с сигма-факторами. Чем больше фермента находится в комплексе Ms1-RNAP, тем ниже общий уровень транскрипции в клетке. Такой комплекс нестабилен и быстро распадается, поэтому эффективность секвестирования фермента и, следовательно, замедления транскрипции, напрямую зависит от концентрации малой РНК. В экспоненциальной фазе роста малая РНК Ms1 активно подвергается деградации при помощи фермента полинуклеотидфосфорилазы (PNPase). В стационарной фазе роста бактерии концентрация PNPase падает, малая РНК Ms1 накапливается и более эффективно секвестрирует РНК-полимеразу,

подавляя общий уровень транскрипции. Также обнаружено, что малая РНК положительно влияет на экспрессию β и β' -субъединиц РНК-полимеразы. При делеции малой РНК Ms1 концентрация РНК-полимеразы снижалась, из-за чего в мутанте не наблюдалось драматического повышения уровня транскрипции. В диком типе *M. smegmatis* в стационарной фазе концентрация РНК-полимеразы остаётся высокой, но активность фермента снижена. Это позволяет бактерии быстро вернуться к активному состоянию транскрипции при благоприятствующих условиях [47].

NCRV12659 (MTS2048)

Малая РНК ncRv12659 найдена в транскриптом *M. tuberculosis* в 2011 году методом RNA-seq [23]. Изучение экспрессии выявило накопление этой малой РНК в модели мышинной инфекции и при голодании [48]. Гиперэкспрессия малой РНК приводила к замедлению роста бактерий и изменениям транскрипции порядка 50 генов. Делеция гена малой РНК не приводила к снижению выживаемости *M. tuberculosis* в нормальных или стрессовых условиях, а также при инфицировании клеточной линии макрофагов [49]. Мишени данной малой РНК на данный момент обнаружить не удалось.

Ген ncRv12659 закодирован в профаге PhiRv2, который встречается не во всех изолятах *M. tuberculosis*. Малая РНК кодируется на участке противоположной цепи гена Rv2660, который на протяжении некоторого времени считался иммуногенным белком, перспективным для создания вакцины [50]. Но при детальном изучении профиля транскрипции методом RNA-seq, полученном с учётом специфичности цепи и проведённом в разных физиологических состояниях бактерии, было показано, что сигнал мРНК, соответствующий гену Rv2660 в клетках *M. tuberculosis* отсутствует, что наиболее вероятно означает, данный белок в принципе не существует [48].

V. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ПАТОГЕН-ХОЗЯИН», ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЕ ПОСРЕДСТВОМ МАЛЫХ РНК

Исследования последних лет указывают на важность бактериальных РНК в патогенезе. Для многих патогенных бактерий изучены механизмы участия некодирующих регуляторных РНК в проявлении их вирулентных свойств, что подробно рассмотрено в недавнем обзоре [51]. Например, показано, что малая РНК ssiS активирует экспрессию многих секреторных факторов вирулентности у бактерий рода

Legionella, и делеция этого гена приводит к значительной аттенуации, а малая РНК HntA способствует регуляции клеточного цикла *Chlamydia trachomatis* и переходу от вегетативной формы к инфекционной.

Установлено, что малые РНК RyhB и SgrS, обнаруживаемые у целого ряда бактерий, и подробно изученные на модельных организмах, также являются важными факторами патогенности и способствуют выживанию бактерий при инфекции. Известно, что SgrS регулирует поступление сахаров в клетку и важна для нормального роста бактерий в условиях повышенной концентрации внеклеточной глюкозы [52]. Хотя её функция сходна у разных представителей энтеробактерий (включая *E. coli*, *Salmonella*, *Y. pestis*, *K. pneumoniae* и др.), у бактерии *Salmonella enterica* SgrS входит в кластер патогенных генов в хромосоме и подавляет экспрессию секретлируемого белка SopD, который является важным фактором вирулентности *Salmonella* при инфекции мышей [53]. Малая РНК RyhB снижает экспрессию железо-связывающих белков – при попадании бактерий в среду с низким содержанием железа это способствует «экономии» дефицитного ресурса. У *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *E. coli* EHEC, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* и *Yersinia pseudotuberculosis* доказана связь данной малой РНК с вирулентностью [51].

Интересно отметить, что у таких возбудителей, как *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* и *Listeria monocytogenes* найдены так называемые РНК-термометры – рибопереключатели, реагирующие на температуру окружающей среды. При попадании в организм хозяина (и, соответственно, повышении температуры до 37°C) они включают экспрессию генов, связанных с вирулентностью.

Малые РНК могут секретироваться в цитоплазму иммунных клеток после фагоцитоза бактерии и влиять на протекание её метаболических процессов, подвергаясь процессингу подобно микроРНК. Эта идея впервые была высказана в 2014 году, и продемонстрирована именно для микобактерий [54], однако мишени малой РНК не были выявлены. Затем в 2016 году Вестерман и соавторы детально описали секрецию малой РНК *Salmonella*, которая секретруется во внутриклеточную среду и процессируется как микроРНК [55]. На данный момент взаимодействие секретлируемых транскриптов бактерий с геномом хозяина становится все более обсуждаемой идеей. Установлено, что РНК бактерий стимулирует врожденный иммунитет в клетках организма-хозяина через взаимодействие с рецепторами группы TLR (Toll-like receptor). [56]. МикроРНК-подобные малые РНК бактерий могут секретироваться во внешнюю среду с помощью микровезикул,

которые затем транспортируются в эукариотические клетки, в следствие чего происходит изменение профиля экспрессии цитокинов [57]. РНК *M. tuberculosis* является одним из ключевых факторов взаимодействия патогена и хозяина. После фагоцитоза бактерии выделяют РНК, которую узнают рецепторы, экспрессирующиеся на внутренней стороне мембраны фагосом: TLR8, TLR7 и TLR3 [58].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малые некодирующие РНК бактерий представляют собой один из уровней регуляции глобального процесса взаимодействия микробной клетки с окружающей средой. В условиях необходимости быстрой адаптации к изменяющимся внешним условиям и последующей синхронизации разнообразных метаболических реакций регуляторная роль малых РНК патогенных бактерий имеет определяющее значение в процессе взаимодействия «патоген-хозяин». Установлено, что малые РНК играют важнейшую роль в ответе на стресс, могут напрямую регулировать экспрессию факторов вирулентности при попадании в подходящие условия или, что встречается чаще, настраивать определенным образом собственные метаболические пути, способствуя выживанию в инфицированном макроорганизме. Детальное изучение этих процессов позволит разработать более эффективные методы диагностики, лечения и профилактики опасных инфекций с участием малых регуляторных РНК. На сегодняшний момент уже предложено использование гена малой РНК *ncrTB_6715* для проведения мультиплексного ПЦР анализа для диагностики ТБ. Данный ген высоко консервативен и представлен только у микобактерий туберкулёзного комплекса, что даёт почти 100% специфичность анализа наряду с хорошей чувствительностью [59]. Кроме того, известно, что профиль экспрессии малых РНК может меняться в условиях антибиотикотерапии [60]. Так, рост *M. tuberculosis* в присутствии изониазида обнаружил дифференциальную экспрессию не только белок-кодирующих генов, но и малых РНК, в том числе B55, G2, MTS1338, MTS0997, F6 и другие [61]. Все это делает малые регуляторные РНК *M. tuberculosis* и патогенных микроорганизмов в целом важнейшим функциональным элементом обеспечения адаптивного ответа на меняющиеся условия окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. (2019) Geneva: Global Tuberculosis Report, 2019.
2. Dye, C. (2006) Global epidemiology of tuberculosis, *Lancet*, **367**(9514), 938–940.
3. Moraco, A.H., Kornfeld, H. (2014) Cell death and autophagy in tuberculosis, *Seminars in Immunology*, **26**(6), 497–511.
4. Bhat, K., Yaseen, I. (2018) *Mycobacterium tuberculosis*: Macrophage takeover and modulation of innate effector responses, *10.5772/intechopen.75003*.
5. Ehrh, S., Schnappinger, D. (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses, *Cellular Microbiology*, **11**(8), 1170–1178.
6. Lerner, T.R., Borel, S., Gutierrez, M.G. (2015) The innate immune response in human tuberculosis, *Cellular Microbiology*, **17**, 1277–1285.
7. Behar, S.M., Divangahi, M., Remold, H.G. (2010) Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nature Reviews Microbiology*, **8**(9), 668–674.
8. Zondervan, N.A., van Dam, J.C.J., Schaap, P.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Suarez-Diez, M. (2018) Regulation of Three Virulence Strategies of *Mycobacterium tuberculosis*: A Success Story, *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 347.
9. Schwenk, S., Arnvig, K.B. (2018) Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics, *Pathogens and Disease*, **76**(4), 1–12.
10. Ажикина Т.Л., Игнатов Д.В., Салина Е.Г., Фурсов М.В., Кап-рельянец А.С. (2015) Роль малых некодирующих РНК в метаболизме бактерий, *Успехи биологической химии*, **55**, 3–32.
11. Taneja, S., Dutta, T. (2019) On a stake-out: *Mycobacterial* small RNA identification and regulation. *Noncoding RNA Research*, **4**(3), 86–95.
12. Wagner, E.G., Romby, P. (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it, *Advances in Genetics*, **90**, 133–208.
13. Bossi, L., Schwartz, A., Guillemardet, B., Boudvillain, M., Figueroa-Bossi, N. (2012) A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a non-coding small RNA, *Genes & Development*, **26**, 1864–1873.
14. Papenfort, K., Vanderpool C.K. (2015) Target activation by regulatory RNAs in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, **39**, 362–378.
15. Frohlich, K.S., Papenfort, K., Fekete, A., Vogel, J. (2013) A small RNA activates CFA synthase by isoform-specific mRNA stabilization, *The EMBO Journal*, **32**, 2963–2979.
16. Sedlyarova, N., Shamovsky, I., Bharati, B.K., Epshtein, V., Chen, J., Gottesman, S., Shroeder, R., Nudler, E. (2016) sRNA-mediated control of transcription termination in *E. coli*, *Cell*, **167**, 111–21.e13.
17. Denham, E.L. (2020) The Sponge RNAs of bacteria – How to find them and their role in regulating the post-transcriptional network, *BBA – Gene Regulatory Mechanisms*, **1863**(8), 194565.
18. Gimpel, M., Brantl, S. (2017) Dual-function small regulatory RNAs in bacteria, *Molecular Microbiology*, **103**(3), 387–397.
19. Płociński P., Macios, M., Houghton, J., Niemiec, E., Płocińska, R., Brzostek, A., Słomka, M., Dziadek, J., Young, D., Dziembowski, A. (2019) Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic acids research*, **47**(11), 5892–5905.
20. Livny, J., Brencic, A., Lory, S., Waldor, M.K. (2006) Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using

- the bioinformatic tool sRNAPredict2, *Nucleic Acids Research*, **34**(12), 3484–3493.
21. Arnvig, K.B., Young, D.B. (2009) Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, **73**(3), 397–408.
 22. DiChiara, J.M., Contreras-Martinez, L.M., Livny, J., Smith, D., McDonough, K.A., Belfort, M. (2010) Multiple small RNAs identified in *Mycobacterium bovis* BCG are also expressed in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*, *Nucleic Acids Research*, **38**(12), 4067–4078.
 23. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton, J., Boshoff, H., Croucher, N.J., Rose, G., Perkins, T.T., Parkhill, J., Dougan, G., Young, D.B. (2011) Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, **7**(11), e1002342.
 24. Miotto, P., Forti, F., Ambrosi, A., Pellin, D., Veiga, D.F., Balazsi, G., Gennaro, M.L., Di Serio, M., Ghisotti, D., Cirillo, D.M. (2012) Genome-Wide Discovery of Small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS ONE*, **7**(12), e51950.
 25. Pellin, D., Miotto, P., Ambrosi, A., Cirillo, D.M., Di Serio, C. (2012) A genome-wide identification analysis of small regulatory RNAs in *Mycobacterium tuberculosis* by RNA-seq and conservation analysis, *PLoS ONE*, **7**(3), e32723.
 26. Wang, M., Fleming, J., Li, Z., Li, C., Zhang, H., Xue, Y., Chen, M., Zhang, Z., Zhang, X.-E., Bi, L. (2016) An automated approach for global identification of sRNA-encoding regions in RNA-Seq data from *Mycobacterium tuberculosis*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **48**(6), 544–553.
 27. DeJesus, M., Gerrick, E.R., Xu, W., Park, S.W., Long, J.E., Boutte, C.C., Rubin, E.J., Schnappinger, D., Ehrhart, S., Fortune, S.M., Sassetti, C.M., Ioerger, T.R. (2017) Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis, *mBio*, **8**(1), e02133–16.
 28. Gerrick, E.R., Barbier, T., Chase, M.R., Xu, R., François, J., Lin, V.H., Szucs, M.J., Roch, J.M., Ahmad, R., Tjaden, B., Livny, J., Fortune, S.M. (2018) Small RNA profiling in *Mycobacterium tuberculosis* identifies Mrsl as necessary for an anticipatory iron sparing response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(25), 6464–6469.
 29. Ami, V.K.G., Balasubramanian, R., Hegde, S.R. (2020) Genome-wide identification of the context-dependent sRNA expression in *Mycobacterium tuberculosis*, *BMC Genomics*, **21**, 167.
 30. Solans, L., Gonzalo-Asensio, J., Sala, C., Benjak, A., Uplekar, S., Rougemont, J., Guilhot, C., Malaga, W., Martin, C., Cole, S.T. (2014) The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS Pathogens*, **10**(5), e1004183.
 31. Wiker, H.G., Harboe, M. (1992) The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology Reviews*, **56**, 648–661.
 32. Flores, A.R., Parsons, L.M., Pavelka, M.S. Jr. (2005) Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics, *Microbiology*, **151**, 521–532.
 33. Tsai, C.-H., Baranowski, C., Livny, J., McDonough, K.A., Wade, J.T., Contreras, L.M. (2013) Identification of novel sRNAs in Mycobacterial species, *PLoS ONE*, **8**(11), e79411.
 34. Prakash, P., Yellaboina, S., Ranjan, A., Hasnain, S.E. (2005) Computational prediction and experimental verification of novel IdeR binding sites in the upstream sequences of *Mycobacterium tuberculosis* open

- reading frames, *Bioinformatics*, **21**, 2161–2166.
35. Jacques, J.F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., Massé, E. (2006) RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, **62**, 1181–1190.
 36. Mai, J., Rao, C., Watt, J., Sun, X., Lin, C., Zhang, L., Lui, J. (2019) *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones, *Nucleic Acids Research*, **47**(8), 4292–4307.
 37. Budell, W.C., Germain, G.A., Janisch, N., McKie-Krisber, Z., Jayaprakash, A.D., Resnick, A.E., Quadri, L.E.N., (2019) Transposon mutagenesis in *Mycobacterium kansasii* links a small RNA gene to colony morphology and biofilm formation and identifies 9,885 intragenic insertions that do not compromise colony outgrowth, *Microbiology Open*, **9**(4), e988.
 38. Houghton, J., Rodgers, A., Rose, G., Arnvig, K.B. (2020) The *Mycobacterium tuberculosis* sRNA F6 regulates expression of *groEL/S*, *bioRxiv*, 2020.07.15.204107.
 39. Игнатов Д.В., Тимошина О.Ю., Логунова Н.Н., Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л. (2014) Экспрессия малых РНК *Mycobacterium tuberculosis* в мышинных моделях туберкулезной инфекции, *Биоорганическая химия*, **40**(2), 253.
 40. Ignatov, D.V., Salina, E.G., Fursov, M.V., Skvortsov T.A., Azhikina, T.L., Kaprelyants, A.S. (2015) Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA, *BMC Genomics*, **16**, 954.
 41. Pelly, S., Bishai, W.R., Lamichhane, G. (2012) A screen for non-coding RNA in *Mycobacterium tuberculosis* reveals a cAMP-responsive RNA that is expressed during infection, *Gene*, **500**(1), 85–92.
 42. Girardin, R.C., Bai, G., He, J., Sui, H., McDonough, K.A. (2018) AbmR (Rv1265) is a novel transcription factor of *Mycobacterium tuberculosis* that regulates host cell association and expression of the non-coding small RNA Mcr11, *Molecular Microbiology*, **110**(5), 811–830.
 43. Girardin, R.C., McDonough, K.A. (2019) Small RNA Mcr11 requires the transcription factor AbmR for stable expression and regulates genes involved in the central metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Microbiology*, **113**(2), 504–520.
 44. Moores, A., Riesco, A.B., Schwenk, S., Arnvig, K.B. (2017). Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS ONE*, **12**(3), e0174079.
 45. Salina, E.G., Grigorov, A., Skvortsova, Y., Majorov, R., Bychenko, O., Ostrik, A., Logunova, N., Ignativ, D., Kaprelyants, A., Apt, A., Azhikina, T.L. (2019) 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*, **9**, 405.
 46. Острик А.А., Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., Григоров А.С., Быченко О.С., Капельянец, А.С., Ажикина Т.Л. (2020) Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro*, *Прикладная Биохимия и Микробиология*, **56**(4), 336–341.
 47. Šiková, M., Janoušková, M., Ramaníuk, O., Páleníková, P., Pospíšil, J., Bartl, P., Suder, A., Pajer, P., Kubičková, P., Pavliš, O., Hradilová, M., Vítovska, D., Šanderová, H., Převorovský, M., Hnilicová, J., Krásný, L. (2019) Ms1 RNA increases the amount of RNA polymerase in *Mycobacterium smegma-*

- tis*, *Molecular Microbiology*, **111**(2), 354–372.
48. Houghton, J., Cortes, T., Schubert, O., Rose, G., Rodgers, A., De Ste Croix, M., Aebersold, R., Young, D.B., Arnvig, K.B. (2013) A small RNA encoded in the Rv2660c locus of *Mycobacterium tuberculosis* is induced during starvation and infection, *PLoS One*, **8**(12), e80047.
 49. Houghton, J. (2015) The Regulatory Role of sRNAs in *Mycobacterium tuberculosis*: A thesis for the degree of Doctor of Philosophy, L.: The National Institute for Medical Research, 265.
 50. Aagaard, C., Hoang, T., Dietrich, J., Cardona, P.J., Izzo, A., Dolganov, G., Schoolnik, G.K., Cassidy, J.P., Billeskov, R., Andersen, P. (2011) A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure, *Nature medicine*, **17**, 189–194.
 51. Westermann, A.J. (2018) Regulatory RNAs in Virulence and Host-Microbe Interactions. *Microbiology Spectrum*, **6**(4), 10.1128
 52. Bobrovskyy, M., Vanderpool, C.K. (2014) The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 61.
 53. Jiang, X., Rossanese, O.W., Brown, N.F., Kujat-Choy, S., Galán, J.E., Finlay, B.B., Brummell, J.H. (2004) The related effector proteins SopD and SopD2 from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribute to virulence during systemic infection of mice. *Molecular Microbiology*, **54**(5), 1186–1198.
 54. Furuse, Y., Finethy, R., Saka, H.A., Xet-Mull, A.M., Sisk, D.M., Jurcic Smith, K.L., Lee, S., Coers, J., (2014) Search for MicroRNAs Expressed by Intracellular Bacterial Pathogens in Infected Mammalian Cells, *Plos One* **9**(9), e106434.
 55. Westermann, A.J., Förstner, K.U., Amman, F., Barquist, L., Chao, Y., Schulte, L.N., Müller, L., Reinhardt, R., Stadler, P.F., Vogel, J. (2016) Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions, *Nature*, **529**(7587), 496–501.
 56. Lee, J., Lee, S., Kim, K.K., Lim, Y.-J., Choi, J.-A., Cho, S.-A., Park, C., Song, C.-H. (2019) Characterisation of genes differentially expressed in macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* through RNA-Seq analysis. *Scientific Reports* **9**, 4027.
 57. Choi, J.-W., Kim, S.C., Hong, S.-H., Lee, H.J. (2017) Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens, *Journal of Dental Research*, **96**, 458–466.
 58. Burkert, S. and Schumann, R.R. (2020) RNA Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Impact on TB Vaccination Strategies, *Vaccines*, **8**, 67.
 59. Kanniappan, P., Ahmed, S.A., Rajasekaram, G., Marimuthu, C., Ch'ng, E.S., Pee, L.P., Raabe, C.A., Rozhdestvensky, T.S., Tang, T.H. (2017) RNomic identification and evaluation of npcTB_6715, a non-protein-coding RNA gene as a potential biomarker for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**(10), 2276–2283.
 60. Dersch, P., Khan, M. A., Mühlen, S., Görke, B. (2017) Roles of Regulatory RNAs for Antibiotic Resistance in Bacteria and Their Potential Value as Novel Drug Targets, *Frontiers in microbiology*, **8**, 803.
 61. Jeeves, R.E., Marriott, A.A.N., Pullan, S.T., Hatch, K.A., Allnutt, J.C., Freire-Martin, I., Hendon-Dunn, C.L., Watson, R., Witney, A.A., Tyler, R.H., Arnold, C., Marsh, P.D., McHugh, T.D., Bacon, J. (2015) *Mycobacterium tuberculosis* is resistant to isoniazid at a slow growth rate by single nucleotide polymorphisms in katG codon Ser315, *Plos One*, **10**(9), e0138253.