



адаптации микроорганизмов (рук. д.б.н. Салина Е.Г.) в должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель – доктор биологических наук Салина Елена Геннадьевна, руководитель группы биохимии адаптации микроорганизмов.

По результатам рассмотрения диссертации «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» приняло следующее заключение:

### **Актуальность работы**

Опасность туберкулёзной инфекции для человечества сложно переоценить. Ежегодно в мире регистрируется около 10 миллионов новых случаев инфекции и примерно 1,5 миллиона смертельных исходов. Принято считать, что туберкулёзом инфицирована четверть всего населения Земли, но у подавляющего числа лиц она никак не обнаруживается, приводя к латентной инфекции – бессимптомному носительству. Это обусловлено способностью возбудителя инфекции *Mycobacterium tuberculosis* к долгому пребыванию внутри организма человека с сохранением риска развития инфекционного заболевания.

Длительное сохранение жизнеспособных микобактерий внутри организма человека объясняется их способностью переходить в состояние отсутствия деления и роста в ответ на неоптимальные внешние условия. Данное физиологическое состояние характеризуется подавлением процессов центрального метаболизма, значительно сниженным уровнем репликации и чрезвычайной устойчивостью к защитным механизмам иммунной системы и медикаментозному лечению, при этом сохраняется возможность реактивации бактерий из покоящегося состояния при наступлении благоприятных условий.

Адаптация бактерий к неблагоприятным внешним условиям происходит за счёт регуляции уровня экспрессии генов. Ключевую роль в этом процессе играют малые РНК, способные в ответ на определённые сигналы «подстраивать» метаболизм бактерии под меняющиеся условия среды. Малые РНК подразделяют на цис- и транс-кодируемые РНК в зависимости от их расположения в геноме относительно регулируемого гена. Цис-кодируемые малые РНК закодированы на комплементарной цепи регулируемого гена, а транс-кодируемые РНК могут быть расположены в любом участке генома, и, как правило, имеют несколько генов-мишеней. Изучение регуляторной роли малых РНК в метаболизме *M. tuberculosis* является перспективным направлением биохимических исследований, переживающим в настоящее время бурное развитие. У *M. tuberculosis* экспериментально подтверждено наличие по крайней мере 20 малых транс-кодируемых РНК, но только 8 из них охарактеризованы достаточно подробно.

Малые РНК Mcr11 и DrrS *M. tuberculosis* присутствуют только у патогенных микобактерий туберкулезного комплекса, то есть способных вызывать туберкулез человека и животных. Было установлено, что уровень их экспрессии нарастает при переходе в стационарную фазу роста, а также при воздействии на клетки ряда стрессовых факторов, с которыми *M. tuberculosis* сталкивается при взаимодействии с клетками иммунной системы. Особенно сильно уровень экспрессии Mcr11 и DrrS возрастает в модели экспериментального туберкулеза у мышей и в покоящемся состоянии *M. tuberculosis*. Эти

факты указывают на важную роль малых РНК Mcr11 и DrrS в регуляции метаболических процессов *M. tuberculosis* при развитии туберкулезной инфекции и взаимодействии с инфицированным организмом. Выявление стратегий адаптации *M. tuberculosis* при инфекции и метаболических путей, в регуляции которых задействованы малые РНК Mcr11 и DrrS, является актуальной биохимической задачей.

**Целью** настоящей работы было изучение роли малых некодирующих РНК DrrS и Mcr11 *M. tuberculosis* в регуляции взаимодействия патогена и макроорганизма при инфекции.

### **Научная новизна**

— Впервые получены штаммы *M. tuberculosis* с делецией генов малых РНК DrrS и Mcr11 и проведена их характеристика при росте *in vitro* и при инфекции *ex vivo* и *in vivo*.

— Впервые получены и проанализированы транскриптомы мутантных штаммов *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией и делецией малых РНК DrrS и Mcr11; обнаружено, что DrrS участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих НАДН-дегидрогеназу, АТФ-синтазу и гены DosR-регулона, играющего основную роль в персистенции *M. tuberculosis* при инфекции. Кроме того, малые РНК Mcr11 и DrrS регулируют уровень экспрессии генов, определяющих патогенность бактерии и кодирующих факторы вирулентности и белки стрессового ответа.

— Доказано участие малой РНК DrrS в формировании устойчивости *M. tuberculosis* к действию внешних стрессовых факторов и выживанию в макрофагах при фагоцитировании.

— Впервые показано, что одной из мишеней малой РНК DrrS может являться ген Rv3679, кодирующий белок с АТФазной активностью и участвующий в метаболизме глицерина.

— Впервые установлено, что делеция генов малых РНК DrrS и Mcr11 вызывает дисбаланс иммунных реакций макроорганизма, наиболее выраженный для штамма  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 с делецией двух малых РНК.

— Впервые показано, что инфекция мышей штаммом *M. tuberculosis* с делецией малой РНК  $\Delta$ DrrS приводит к увеличению времени жизни животных, а инфекция штаммом с делецией  $\Delta$ Mcr11 и двух малых РНК  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 – к сокращению времени жизни животных по сравнению с животными, инфицированными штаммом дикого типа.

— Установлено, что малые РНК DrrS и Mcr11 вовлечены в процессы биохимической регуляции взаимодействия патогена *M. tuberculosis* и макроорганизма при инфекции, и могут оказывать значительное влияние как на успешную адаптацию патогена и сохранение его жизнеспособности при инфекции, так и определять характер течения инфекции для организма-хозяина, модулируя его иммунный ответ.

### **Научно-практическое значение работы**

В ходе работы установлены метаболические пути *M. tuberculosis*, в регуляции которых принимают участие малые РНК Mcr11 и DrrS. На основании анализа профиля транскрипции мутантных штаммов с делецией и гиперэкспрессией Mcr11 и DrrS показано,

что малая РНК DrrS регулирует экспрессию генов, кодирующих НАДН-дегидрогеназу, АТФ-синтазу и гены Dos-регулона, играющего основную роль в персистенции *M. tuberculosis* при инфекции. Кроме того, обнаружено, что малые РНК Mcr11 и DrrS влияют на уровень экспрессии генов патогенности бактерии и факторов вирулентности, а также генов, кодирующих белки стрессового ответа.

Штамм с гиперэкспрессией малой РНК DrrS характеризуется большей устойчивостью к действию стрессовых условий *in vitro* и при фагоцитировании макрофагами. Делеция DrrS вызывает снижение вирулентности *M. tuberculosis*, а делеция Mcr11, и делеция двух малых РНК DrrS и Mcr11 – ее повышение в модели экспериментального ТБ мышей. Данный результат указывает на то, что малые РНК Mcr11 и DrrS могут являться факторами вирулентности *M. tuberculosis*, участвуя в регуляции бактериального метаболизма и персистенции микобактерий в иммунных клетках хозяина в целом. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов взаимодействия *M. tuberculosis* с организмом хозяина и способности бактерий к длительному выживанию в стрессовых условиях. Уровень экспрессии малых РНК Mcr11 и DrrS также может являться диагностическим маркером форм туберкулеза, связанных с длительным персистированием микобактерий в организме, что может быть использовано на практике для разработки новых терапевтических подходов в борьбе с туберкулезом. Штамм с делецией малой РНК DrrS, характеризующийся сниженной вирулентностью, может служить основой для создания вакцинного штамма *M. tuberculosis*.

#### **Конкретное личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад диссертанта заключался в непосредственном получении экспериментальных данных, либо в его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование экспериментов, их проведение, обработку, оформление и интерпретацию полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций. Обсуждение и обобщение некоторых положений диссертации, формулирование цели и задач, выводов и обсуждение результатов проводилось совместно с научным руководителем.

#### **Степень достоверности**

Научные положения и выводы диссертации Мартини Б.А. обоснованы и достоверны, и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

#### **Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите**

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

#### **Апробация работы**

По теме диссертации опубликовано 5 статей в международных научных рецензируемых журналах. Результаты были представлены в виде устных и стендовых докладов на

международных конгрессах и конференциях: EMBO Workshop on Tuberculosis 2022 «From innovation to intervention» в Париже в 2022 году, VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды» в Сочи в 2022 году; XXXIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, в Москве в 2021 году; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» в Москве в 2020 году; II Объединённый научный форум и VI съезд биохимиков России в Дагомысе в 2019 году.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, среди которых 5 статей в международных научных рецензируемых журналах, и 7 тезисов докладов международных и российских конференций.

Статьи в международных рецензируемых журналах:

1. **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*. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 7928.

2. **Острик А.А. (Мартини Б.А.)**, Григоров А.С., Бочарова И.В., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г., Малые РНК Mcr11 и DrrS *Mycobacterium tuberculosis* как возможные регуляторы метаболизма глицерина., Прикл. биохимия и микробиол., 2022, Т. 58, № 4, с. 360–365

3. **Острик А.А. (Мартини Б.А.)**, Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Малые некодирующие РНК и их роль в патогенезе *Mycobacterium tuberculosis*. Успехи биологической химии – 2021. Т. 61, с. 229–252.

4. **Острик А.А. (Мартини Б. А.)**, Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., Григоров А.С., Быченко О.С., Капрельянц А. С., Ажикина Т. Л. Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro* Прикл. биохимия и микробиол., 2020, Т. 56, № 4, с. 336–341.

5. Salina E.G., Grigorov A., Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., **Ostrik A. (Martini B.)**, 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. Front Cell Infect Microbiol. 2019, 9, 405.

Публикации в сборниках и тезисы конференций:

1. **Ostrik A. (Martini B.A.)**, Grigorov A., Salina E., Azhikina T. Small RNAs DrrS and Mcr11 contribute to *Mycobacterium tuberculosis* persistence within host // Сборник тезисов EMBO Workshop on Tuberculosis 2022 «From innovation to intervention», 2022, с. 230

2. **Острик А.А. (Мартини Б.А.)**, Григоров А.С., Скворцова Ю.В., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Регуляторные малые некодирующие РНК Mcr11 и DrrS

*Mycobacterium tuberculosis* и их роль во взаимодействии «патоген-хозяин» // Спецвыпуск ActaNaturae, 2021, Т. 2., с. 38-39

3. Григоров А.С., Салина Е.Г., Быченко О.С., Скворцова Ю.В., **Острик А.А. (Мартини Б.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

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

5. **Острик А.А. (Мартини Б.А.)**, Григоров А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. Малая РНК MTS1338 – потенциальный фактор вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* // Сборник тезисов XXXIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2021, с. 60

6. **Острик А.А. (Мартини Б.А.)**, Салина Е.Г. Перспективы использования малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* для диагностики туберкулёзной инфекции // Сборник тезисов конференции «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020», 2020, с. 59-60

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

#### **Рекомендуемые оппоненты:**

**Владимирский Михаил Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулёзной инфекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России;

**Линге Ирина Андреевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

#### **Рекомендуемая ведущая организация**

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора.

Диссертация «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» Мартини Билли Александровны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий молекулярной генетики, биохимии азотфиксации и метаболизма азота, групп биохимии адаптации микроорганизмов, редактирования геномов микроорганизмов и аналитической группы

Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре - 11 человек. Результаты голосования: «за» - 11 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет. Протокол №5 от 14 июня 2023 г.

*Председатель совместного семинара лабораторий*  
главный научный сотрудник  
доктор биологических наук  
профессор

Шишкин С. С.

*Секретарь*  
младший научный сотрудник группы  
редактирования геномов микроорганизмов

Армянинова Д. К.



«16» июня 2023 г.