

На правах рукописи

МАРТИНИ Билли Александровна

**МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК DRRS И MCR11 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* –  
ФАКТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ “ПАТОГЕН-ХОЗЯИН”**

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в группе биохимии адаптации микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ «Биотехнологии РАН»)

**Научный руководитель:** **Салина Елена Геннадьевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Официальные 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»

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

Защита состоится « 02 » ноября 2023 г. в « 14 » часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Опасность туберкулёзной инфекции для человечества сложно переоценить. Ежегодно в мире регистрируется около 10 миллионов новых случаев инфекции и примерно 1,5 миллиона смертельных исходов (World Health Organization, 2023). 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 (Gengenbacher et al., 2012; Mukamolova et al., 2008). 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 (Gengenbacher et al., 2012; Mukamolova et al., 2008; Peddireddy et al., 2017).

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 (Papenfort et al., 2010; Waters et al., 2009). 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 (Schwenk et al., 2018; Ажикина et al., 2015).

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 (Arnvig et al., 2009). Особенно сильно уровень экспрессии Mcr11 и DrrS возрастает в модели экспериментального туберкулеза у мышей (Игнатов Д.В. et al., 2014) и в покоящемся состоянии *M. tuberculosis* (Ignatov et al., 2015). 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.

**Задачи:**

1. Изучить роль DrrS и Mcr11 в формировании устойчивости к стрессовому воздействию, которому *M. tuberculosis* подвергается при инфекции.
2. Проанализировать участие DrrS и Mcr11 в сохранении жизнеспособности *M. tuberculosis* при фагоцитировании их клетками иммунной системы.
3. Исследовать изменение профиля транскрипции мутантных штаммов с гиперэкспрессией и делецией DrrS и Mcr11, и оценить вовлеченность этих малых РНК в регуляцию основных метаболических путей *M. tuberculosis*
4. Изучить транскриптом костномозговых макрофагов мыши при инфекции их мутантными штаммами  $\Delta$ DrrS,  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11, проследить роль DrrS и Mcr11 в модуляции иммунного ответа макроорганизма.
5. Исследовать характер течения инфекции *in vivo* в моделях экспериментального туберкулеза мышей при инфицировании их мутантными штаммами с делецией DrrS и Mcr11.

**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 персистировании *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.

### **Теоретическая и практическая значимость**

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 туберкулёза, 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*.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В работе активно применялись современные биохимические, молекулярно-биологические и генно-инженерные методы, методы транскриптомики и биоинформатического анализа. В работе также использовались методы классической микробиологии для работы с патогенными бактериальными культурами, цитологические методы работы с клетками эукариот. Работы с животными, включенные в данное исследование, проводили в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123). Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с общепринятыми стандартами.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Малая РНК DrrS участвует в формировании устойчивости клеток к стрессам *in vitro*, моделирующим условия пребывания *M. tuberculosis* в фагосоме при инфекции макроорганизма, и способствует сохранению жизнеспособности микобактерий в макрофагах.
2. В штамме с делецией DrrS наблюдается транскриптомный ответ, указывающий на снижение эффективности центральных метаболических процессов и запуск программы выживания *M. tuberculosis* в стрессовых условиях.
3. В штамме с делецией Mcr11 по данным транскриптомного анализа происходит активация процессов ремоделирования клеточной стенки и подавления биосинтеза факторов вирулентности *M. tuberculosis*.

4. Инфекция костномозговых макрофагов мыши штаммами *M. tuberculosis* с делецией малых РНК DrrS и Mcr11 вызывает дисбаланс иммунных реакций макроорганизма, особенно выраженный при инфекции штаммом с делецией двух малых РНК  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11.
5. Инфекция мышей штаммом *M. tuberculosis*  $\Delta$ DrrS приводит к увеличению времени жизни животных, а штаммом  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 – к сокращению времени жизни животных по сравнению с их временем жизни при инфекции штаммом дикого типа.
6. Малые РНК DrrS и Mcr11 являются регуляторами метаболической адаптации патогена при инфекции, влияя на его жизнеспособность и модулируя иммунный ответ организма-хозяина.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается их воспроизводимостью и согласованностью. Используемые методы исследования и проведённые расчёты корректны, полученные экспериментальные закономерности подтверждены статистическими критериями. Выводы, представленные в диссертационной работе, полностью подтверждены экспериментальными результатами.

### **Личный вклад автора**

Все эксперименты, вошедшие в диссертационную работу, были выполнены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор самостоятельно проводила все микробиологические и биохимические эксперименты *in vitro* и *ex vivo*, осуществляла подготовку образцов для транскриптомного анализа, активно участвовала в конструировании рекомбинантных штаммов *M. tuberculosis* и в подготовке культур для экспериментов *in vivo*.

### **Публикации и апробация работы**

По результатам проведенных экспериментов опубликовано 5 статей в 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.

### **Структура и объем работы**

Полный объём диссертации составляет 185 страниц, в том числе 31 рисунок, 3 таблицы и 11 приложений. Список литературы содержит 257 наименований. Описание представляемого исследования включает общую характеристику работы, обзор литературы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, приложения и список цитируемой литературы.

### **Список сокращений:**

ТБ – туберкулёз, МФ – макрофаги, КММФ – костномозговые макрофаги, wt – штамм *M. tuberculosis* дикого типа, ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены, ФСБР – фосфатно-буферный раствор, MOI – кратность инфицирования,  $\gamma$ -ИФН –  $\gamma$ -интерферон, ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$ , IL – интерлейкин, НТО – нетранслируемая область, DETA-NO – диэтилентриамин-NO, RNA-seq – РНК-секвенирование, Log<sub>2</sub>FC – кратность изменения экспрессии, выраженная через логарифм по основанию 2, ММП – матриксные металлопептидазы.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Изучение штаммов, гиперэкспрессирующих малые РНК Mcr11 и DrrS**

Ранее в нашей лаборатории были получены штаммы *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией малых РНК Mcr11 (Mcr11\_over) и DrrS (DrrS\_over), и показано, что они имеют задержку роста при культивировании *in vitro* на стандартной жидкой среде Сотона в сравнении с контрольным штаммом, трансформированным вектором pMV261, не содержащим вставки (wt\_empty), которая выражается в удлинении лаг-периода, а также увеличении времени удвоения микобактерий (Ignatov et al., 2015). В данной работе эти штаммы использовали для изучения влияния гиперэкспрессии малых РНК на устойчивость *M. tuberculosis* к стрессам, которым они подвергаются в цитоплазме МФ хозяина. Были изучены следующие стрессовые воздействия: 1) закисление среды до pH 5.5; 2) добавление 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (окислительный стресс); 3) внесение 500 мкМ донора оксида азота DETA-NO (нитрозативный стресс); 4) инкубирование бактерий в 10 мкМ ФСБР (стресс недостатка питательных веществ). Оценку степени стрессового воздействия проводили по изменению транскрипционной активности клеток логарифмической фазы роста по отношению к контрольным клеткам, не



подвергавшимся действию стресса, регистрируя уровень включения клетками радиоактивно меченного  $^3\text{H}$ -урацила (рис. 1).

Оказалось, что штамм DrrS-over был более устойчив ко всем видам стрессового воздействия. Несмотря на то, что все изучаемые штаммы демонстрировали снижение уровня включения  $^3\text{H}$ -урацила, штамм DrrS-over сохранял достоверно более высокую транскрипционную активность при всех видах стрессового воздействия по сравнению с контрольным штаммом wt\_empty. Транскрипционная активность штамма Mcr11-over под действием изучаемых видов стрессового воздействия не отличалась от контрольного штамма wt\_empty. Таким образом, гиперэкспрессия малой РНК DrrS приводила к повышенной устойчивости клеток *M. tuberculosis* к различным стрессовым воздействиям *in vitro*, моделирующих условия пребывания бактерий в МФ после фагоцитирования.

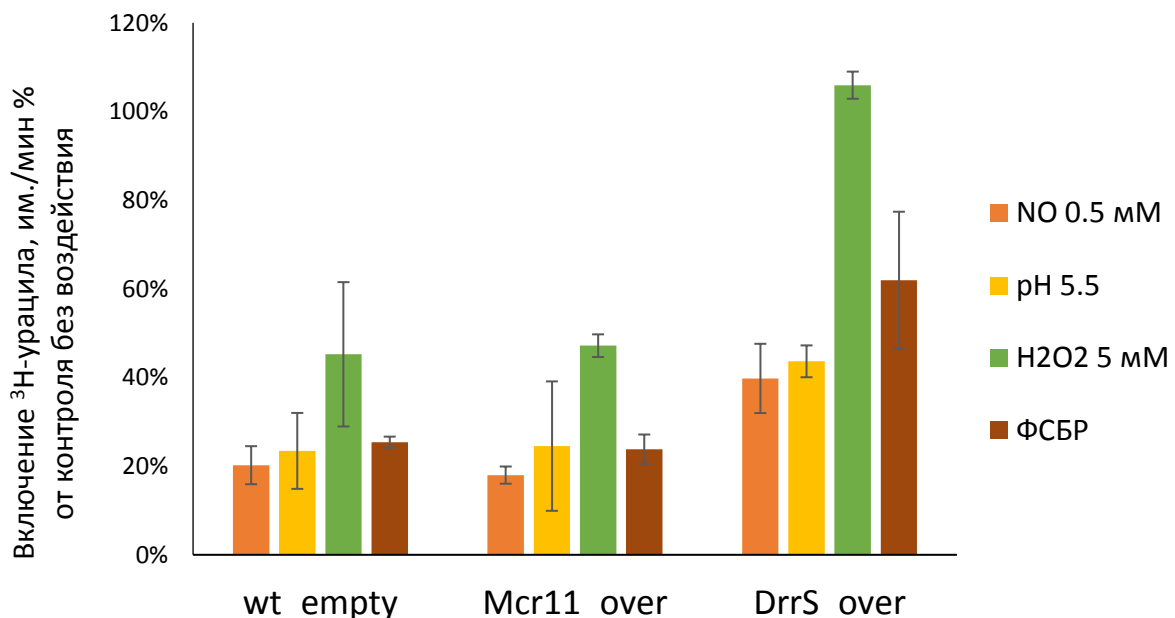


Рис. 1. Изменение транскрипционной активности штаммов Mcr11-over, DrrS-over и wt\_empty *M. tuberculosis*, взятых в логарифмической фазе роста под действием стрессовых факторов: кислой среды – pH 5.5; окислительного стресса – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 мМ; нитрозативного стресса – DETA-NO 500 мкМ в течение 48 ч и нехватки питательных веществ – инкубирование бактерий в 10 мкМ ФСБР в течение 28 сут.

Далее, чтобы оценить вклад малых РНК в способность микобактерий приспосабливаться к внутриклеточному существованию, проводили инфекцию культуры клеток THP-1, дифференцированной в МФ, штаммами *M. tuberculosis* DrrS\_over, Mcr11\_over и wt\_empty с кратностью инфицирования 2 (MOI=2).

Выживаемость бактерий определяли, высевая лизаты МФ на плотную питательную среду в определенных временных точках и подсчитывая число КОЕ. Было выявлено, что гиперэкспрессия DrrS положительно влияла на выживаемость поглощенных микобактерий во всех временных точках (рис. 2), а гиперэкспрессия Mcr11 не оказывала существенного влияния. Ранее было обнаружено, что клетки непатогенной бактерии *M. smegmatis* с гетерологической экспрессией DrrS также характеризовались большей устойчивостью при внутриклеточном выживании при инфекции ими МФ линии RAW 264.7, кроме того, бактерии штамма DrrS-over *M. smegmatis* вызывали снижение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов у МФ по сравнению с контрольным штаммом *M. smegmatis* без гиперэкспрессии (Vychenko et al., 2021).

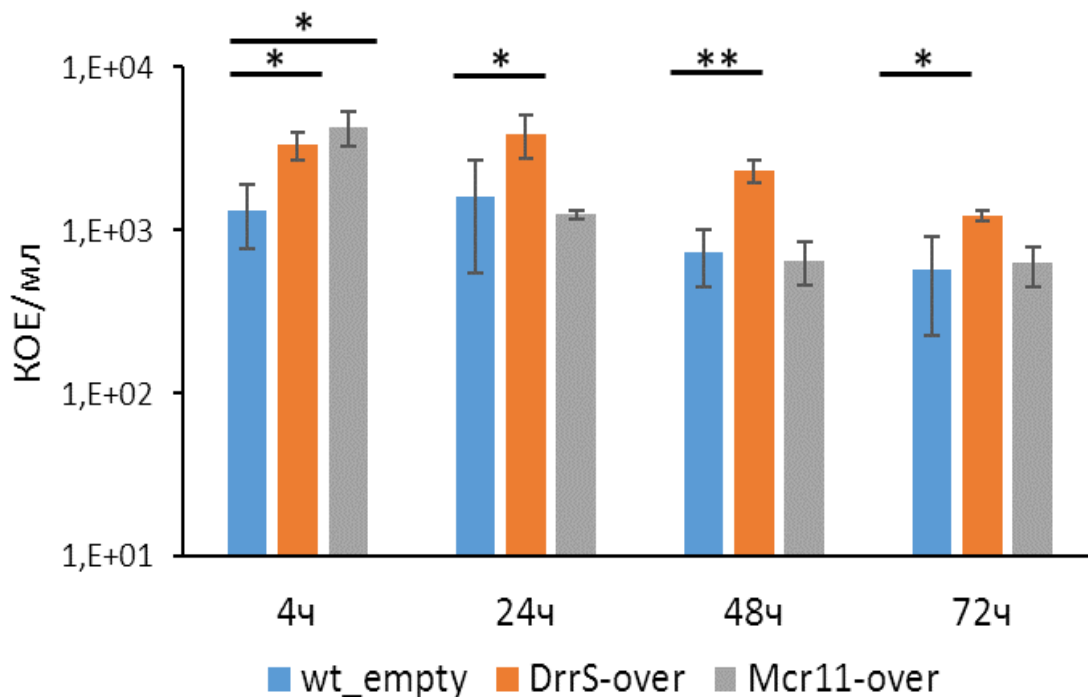


Рис. 2. Выживаемость штаммов DrrS\_over, Mcr11\_over и wt\_empty *M. tuberculosis* при инфекции клеток линии THP-1, дифференцированных в МФ, при MOI=2; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## 2. Создание штаммов *M. tuberculosis* с делецией генов малых РНК DrrS и Mcr11

К моменту начала данной работы штаммы с делецией генов малых РНК *M. tuberculosis* еще никем не были получены. Для создания штаммов с делецией малых РНК нами был выбран метод гомологичной рекомбинации, который

является предпочтительным для делеции белок-кодирующих генов *M. tuberculosis*. Основой для создания конструкции для гомологичной рекомбинации был выбран вектор p2NIL (Parish et al., 2000), который не способен реплицироваться в клетках *M. tuberculosis*. Участок делеции представлял собой последовательность «зрелой» малой РНК, для DrrS это 117 п.н., для Mcr11 – 131 п.н. Также в конструкцию была клонирована кассета из вектора pGOAL19, содержащая гены устойчивости к антибиотику гигромицину *HygR*, ген токсичности сахарозы *sucB* и ген  $\beta$ -галактозидазы *lacZ*, необходимые для последующего отбора целевых вариантов рекомбинации (рис. 3).

В соответствии со схемой, представленной на рис. 3, был получен штамм  $\Delta$ Mcr11 с делецией гена Mcr11, штамм  $\Delta$ DrrS с делецией гена DrrS, а затем в штамме  $\Delta$ Mcr11 произвели делецию гена DrrS с получением штамма делецией двух малых РНК  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11. Полученные штаммы  $\Delta$ DrrS,  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 не имели чужеродных геномных вставок и не требовали внесения селектирующих факторов в среды культивирования, то есть могли использоваться в тех же условиях, что и дикий тип *M. tuberculosis*, в том числе для моделирования хронической инфекции у животных. Геномы мутантных штаммов депонированы в базе данных NCBI SRA и могут быть найдены по номеру: ID PRJNA701202.

### 3. Транскриптомный анализ штаммов $\Delta$ DrrS и $\Delta$ Mcr11

Методом RNA-seq был проведен полный транскриптомный анализ штаммов *M. tuberculosis* с делециями малых РНК  $\Delta$ Mcr11,  $\Delta$ DrrS в логарифмической (LOG) и стационарной (STAT) фазе роста. В качестве контроля использовали штамм дикого типа wt. Общее число дифференциально-экспрессированных генов (ДЭГ), для которых значение  $|\text{Log}_2\text{FC}|$  было более 1.5, приведено в таблице 1.

Табл. 1. Число ДЭГ в штаммах  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta$ DrrS по сравнению со штаммом дикого типа,  $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1.5$ .

	$\Delta$ DrrS		$\Delta$ Mcr11	
	LOG	STAT	LOG	STAT
повышение экспрессии	19	112	6	53
понижение экспрессии	27	150	9	94
всего ДЭГ	46	262	15	147

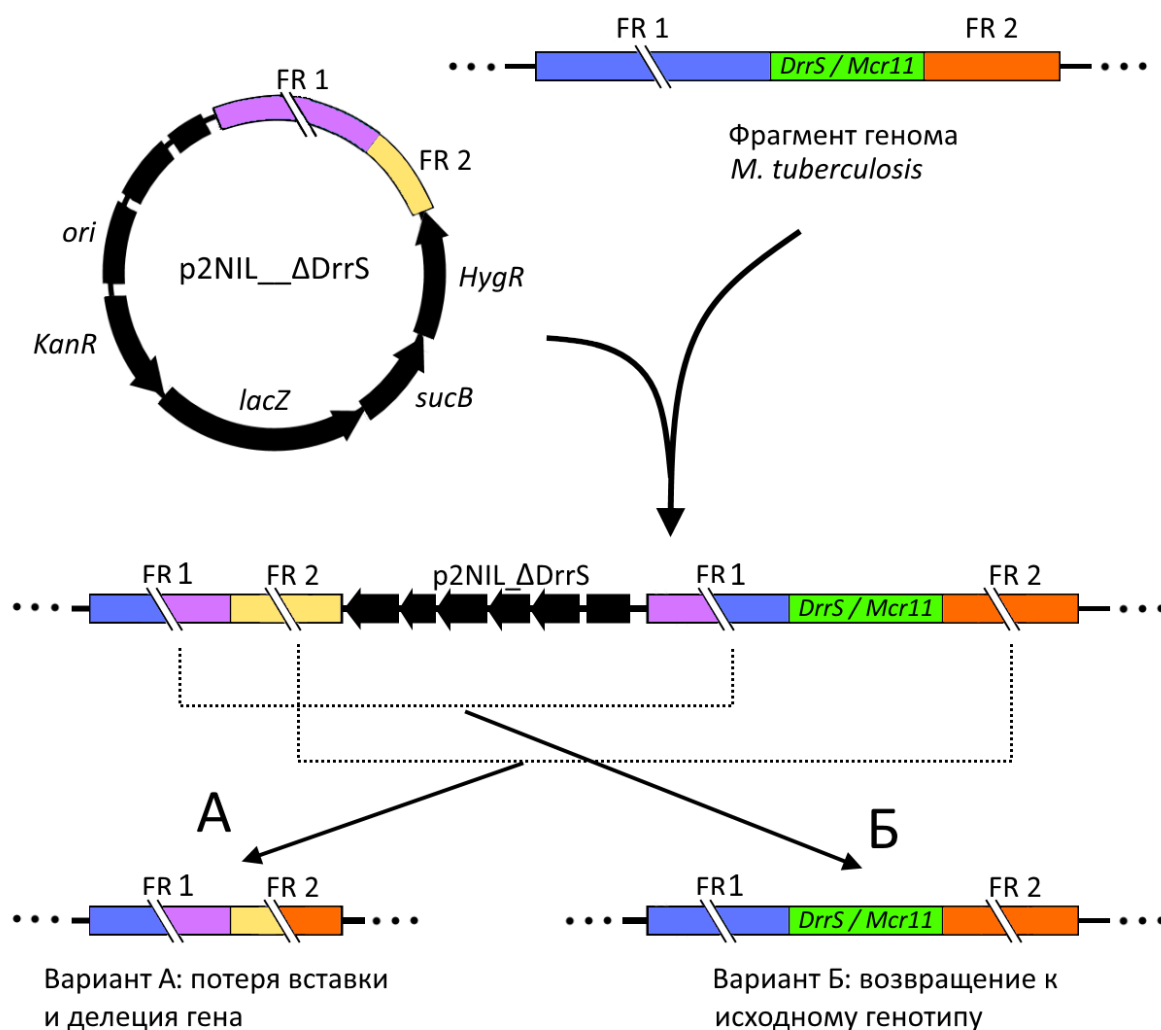


Рис. 3. Схема получения немаркированного штамма с делецией гена малой РНК DrrS или Mcr11 *M. tuberculosis*. FR1 и FR2 – участки генома, фланкирующие ген DrrS или Mcr11. Реализация первого кроссовера: последовательность плазмиды встраивается в геном в результате гомологичной рекомбинации с FR1 (равновероятна рекомбинация по FR2). Второй кроссовер: потеря участка, содержащего плазмиду с маркерами (выделен пунктирной линией). В результате гомологичной рекомбинации по FR2 формируется мутантный генотип (вариант А), а при рекомбинации по FR1 возвращается начальный генотип (вариант Б).

### Транскриптомный анализ штамма ΔDrrS

В штамме с делецией гена малой РНК DrrS в логарифмической фазе роста среди ДЭГ были обнаружены гены, связанные с патогенностью бактерии, и гены, кодирующие белки, участвующие в формировании клеточной стенки. В частности, снижалась экспрессия генов, кодирующих белки LipQ, EspA, EspD, Rv3613c, а также PE-PGRS-5,7,14,15,21,54,56,57, ассоциированных с вирулентностью *M. tuberculosis*, причем ген *lipQ*, кодирующий карбоксилэстеразу, имел максимальный уровень

снижения экспрессии по отношению к клеткам контрольного штамма дикого типа (в 5.23 раза). LipQ, как известно, является высокоиммуногенным белком, который вызывает значительное снижение продукции провоспалительных цитокинов, таких, как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и  $\gamma$ -интерферон ( $\gamma$ -ИФН), и повышение продукции противовоспалительных цитокинов, таких, как интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-10 (IL-10) в инфицированных МФ (Kumar et al., 2017). Снижение продукции провоспалительных цитокинов и повышение продукции противовоспалительных цитокинов является одной из ключевых стадий адаптации микобактерий в организме хозяина при инфекции. Кроме того, в штамме  $\Delta$ DrrS повышается экспрессия гена *icl1*, кодирующего изоцитратлиазу – ключевой фермент глиоксилатного цикла, который катализирует расщепление изоцитрата на глиоксилат и сукцинат. Глиоксилатный цикл является альтернативой традиционному циклу лимонной кислоты, и преимущественно используется микобактериями при инфекции, а также при переходе в покоящееся состояние, когда основным источником углерода служат жирные кислоты (Eisenreich et al., 2010; McKinney et al., 2000). В штамме  $\Delta$ DrrS была увеличена экспрессия генов, кодирующих белки AhpC и AhpD – алкилгидропероксидредуктазы, которые участвуют в ответе клетки на окислительный стресс (Hillas et al., 2000). В 4,5 раза увеличивается экспрессия белка PPE51, который располагается во внешней мембране *M. tuberculosis* и участвует в транспорте питательных веществ внутрь клетки (Babu Sait et al., 2022).

Транскриптомный анализ штамма  $\Delta$ DrrS в стационарной фазе роста выявил большее количество ДЭГ по сравнению с логарифмической фазой, что может быть объяснено усилением гетерогенности внутри бактериальной популяции при переходе в стационарную фазу роста, а также тем, что именно в стационарной фазе возрастает экспрессия DrrS у штамма дикого типа, и её отсутствие в этой фазе будет более заметно для клетки (Arnvig et al., 2009). Было обнаружено снижение экспрессии генов, кодирующих гены аэробной дыхательной цепи и энергетического обмена. Так, снижался уровень экспрессии генов *nuoA–N*, кодирующих протон-транспортирующую НАДН-дегидрогеназу I типа, сопряженную с дыхательной цепью, и генов *atpB, D–H* кодирующих субъединицы АТФ-синтазы (рис. 4, 5). Эти ферменты центрального метаболизма используются микобактериями при активном росте в аэробных условиях, а их супрессия указывает на недостаток кислорода и/или переход в состояние персистенции и гипобиоза (Cook et al., 2014). При этом была повышена экспрессия гена *ndh*, кодирующего НАДН-дегидрогеназу II типа, несопряженную с дыхательной цепью, и генов *cydAB*, кодирующих субъединицы цитохром-bd-оксидазы. Оба этих

фермента также активируются в условиях гипоксии, обеспечивая альтернативный транспорт электронов, что используется в состоянии покоя *M. tuberculosis* и при персистенции (Awasthy et al., 2014; Kana et al., 2001; Yano et al., 2014). Кроме того, повышалась экспрессия генов нитратного дыхания: *nirB,D*, *narK2,K3,U,X*, кодирующих нитритредуктазу и нитрит-нитратный экспортёр, что может свидетельствовать о переключении дыхательной цепи *M. tuberculosis* в отсутствие DrrS на альтернативные акцепторы электронов (Akhtar et al., 2013). Активация нитратного дыхания также характерна для анаэробнозиса и персистенции *M. tuberculosis* (Салина Е.Г., 2020). На рис. 4 представлена гипотетическая схема «переключения» метаболизма клеток штамма  $\Delta$ DrrS *M. tuberculosis* на альтернативный транспорт электронов.

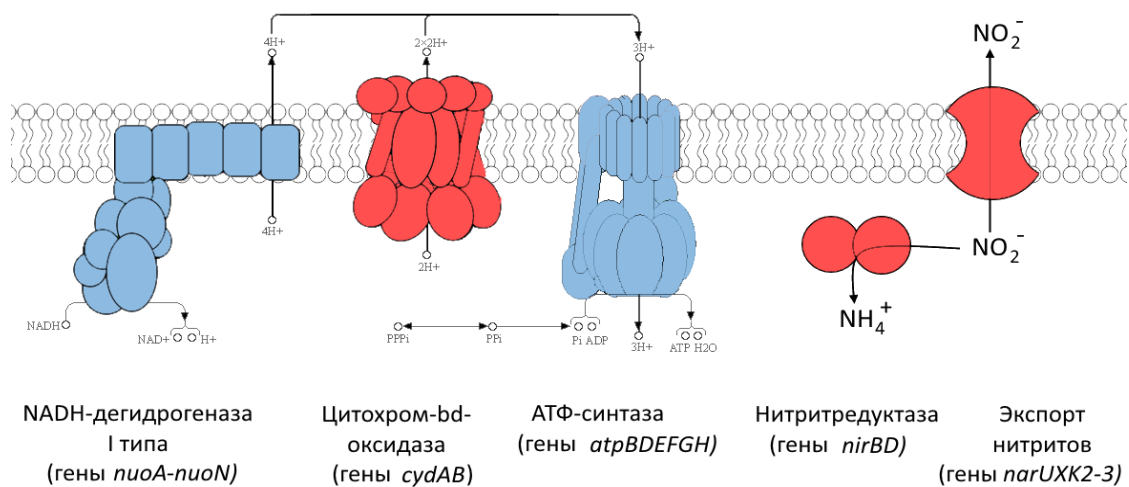


Рис. 4. Гипотетическая схема угнетения аэробного и активации нитратного дыхания в клетках штамма  $\Delta$ DrrS *M. tuberculosis* (по данным RNA-seq). Синим цветом обозначены ингибированные комплексы ферментов, красным – активированные.

В транскриптом штамма  $\Delta$ DrrS в стационарной фазе обнаружено повышение экспрессии белка DosR (Rv3133c, также называемый DevR), который является ключевым регулятором покоя *M. tuberculosis* в условиях гипоксии (De Majumdar et al., 2012; Park et al., 2003; Sherman et al., 2001), а также большинства генов, входящих в регулируемый им «регулон покоя» (DosR-регулон). Известно, что гены DosR-регулона также индуцируются не только в ответ на гипоксию, но и на присутствие оксида азота в статической культуре, а также при инфекции МФ мышей и в модели инфекции морских свинок (Sharma et al., 2006; Voskuil et al., 2004). Недавно Мурс и др. показали, что ген DrrS имеет в промоторной области специфическую последовательность, узнаваемую регулятором DosR и экспрессия малой РНК DrrS является DosR-зависимой (Moore et al., 2017). Среди генов DosR-регулона высокий уровень экспрессии продемонстрировал *glnN*, кодирующий

гемоглобин-N (повышение экспрессии в 45 раз), который обеспечивает устойчивость клетки к NO-стрессу (Ouellet et al., 2002). Повышена была экспрессия гена *oxyS* – ранее было показано, что повышение экспрессии этого гена снижает активность оксидоредуктаз и увеличивает чувствительность микобактерий к окислительному стрессу (Domenech et al., 2001). Также обнаруживалось повышение экспрессии большого числа генов, кодирующих белки семейства PE-PPE, главным образом локализованных на поверхности микомембраны и принимающих участие во взаимодействии с клетками иммунной системы хозяина (Fishbein et al., 2015). Кроме того, в мутантном штамме  $\Delta DrrS$  была снижена экспрессия генов, кодирующих рибосомальные белки: *rpsN2* и *rpsR2* (30S субъединицы), *rpmB1* и *rpmB2* (50S субъединицы), что указывает на угнетение процессов трансляции (рис. 5). Кроме того, в стационарной фазе роста  $\Delta DrrS$  был понижен уровень экспрессии генов, кодирующих белки комплекса Mce1 (*mce1ABCDER*; *yrbE1A-B*), который обеспечивает транспорт липидов через клеточную стенку микобактерий, а также обеспечивает выживаемость *M. tuberculosis* внутри МФ (Klepp et al., 2022). Связанный с этим комплексом ген *fcot*, кодирующий тиоэстеразу длинноцепочечных жирных кислот, играет роль в вирулентности микобактерий, и также имеет сниженную экспрессию в штамме  $\Delta DrrS$  (Wang et al., 2007). Сниженной оказалась экспрессия гена *fadA*, кодирующего ацетил-КоА ацетилтрансферазу – секретлируемого фермента, который превращает ацил-КоА из клетки хозяина в ацето-ацетил-КоА, в результате чего уровень эукариотической ацетил-КоА снижается, что приводит к угнетению воспалительного ответа МФ за счёт понижения уровня ацетилирования гистонов (Yang et al., 2021). Также была снижена экспрессия других генов липидного метаболизма: *fadD5*, *fadD11*, *fadD11.1*, *accD2*, *fbpC* (рис. 5).

В целом, можно сделать вывод о том, что транскриптом штамма  $\Delta DrrS$  *M. tuberculosis* указывает на угнетение центральных метаболических процессов: аэробного дыхания, синтеза АТФ и трансляции, и активацию несопряженной НАДН-дегидрогеназы II типа, альтернативных акцепторов электронов, DosR-регулона и самого белка DosR - ключевого регулятора покоя *M. tuberculosis*. Подобный транскриптомный ответ ранее обнаруживался не только в условиях гипоксии (Muttucumaru et al., 2004; Voskuil et al., 2004), но и в покоящихся «некультивируемых» клетках *M. tuberculosis*, полученных в аэробных условиях (Ignatov et al., 2015). Кроме того, в транскриптоме штамма  $\Delta DrrS$  нами была обнаружена активация маркёров окислительного и нитрозативного стресса, а также белков стрессового ответа. При этом была снижена экспрессия генов, кодирующих белки, необходимые для вирулентности *M. tuberculosis* и взаимодействия с клетками иммунной системы макроорганизма.

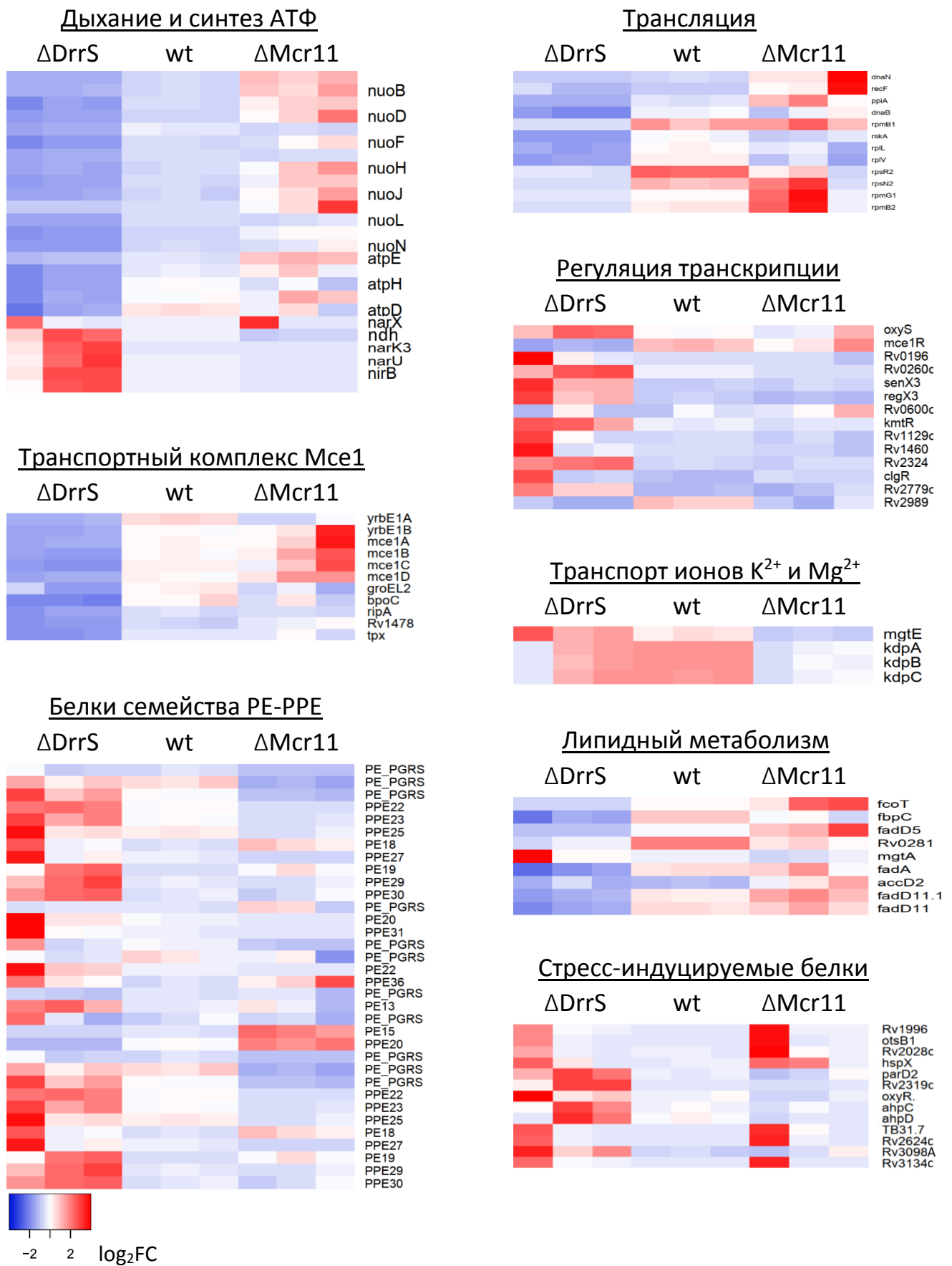


Рис. 5. Анализ ДЭГ в штаммах с делециями малых РНК *M. tuberculosis* ΔDrrS, ΔMcr11 и wt в стационарной фазе роста



### Транскриптомный анализ ΔMcr11

В транскриптоме ΔMcr11 в логарифмической фазе роста было обнаружено снижение экспрессии генов белков семейства PE\_PGRS 4,7,54,57 и генов из категории мобильных генетических элементов Rv2657c, Rv1199c, Rv2666. При этом повышалась экспрессия гена Rv3109, который кодирует фермент синтеза молибденового кофактора MoaA1, гена изониазид-индуцируемого белка IniB и гена транскрипционного регулятора WhiB6, который регулирует экспрессию генов системы секреции ESX-1 которая, в свою очередь, необходима для патогенеза *M. tuberculosis* (Bosserman et al., 2017).

Как и в случае ΔDrrS, в стационарной фазе роста ΔMcr11 менялась экспрессия гораздо большего числа генов по сравнению с логарифмической фазой. Многие обнаруженные ДЭГ относятся к категориям центрального метаболизма и дыхания, процессов формирования клеточной стенки и к семейству белков PE\_PGRS (рис. 5). К примеру, наблюдалась индукция гена *pfkB*, кодирующего фосфофруктокиназу – ключевой фермент гликолиза. У микобактерий данный фермент представлен в двух изоформах: PfkA и PfkB, причем PfkB активируется в *M. tuberculosis* при попадании в гипоксические условия (Snášel et al., 2021). *pfkB* входит в оперон Rv2028c-Rv2031c, кодирующий ряд белков, предположительно тоже участвующих в метаболизме углеводов, а также синтезе нуклеотидов. Этот оперон регулируется геном *hspX*, кодирующим универсальный белок стрессового ответа (Cunningham et al., 1998), который, как и гены Rv2028c-Rv2031c, входит в регулон DosR. В ΔMcr11 снижался уровень экспрессии *prpC* и *prpD*, кодирующих метилцитратсинтазу и метилцитратдегидротазу, соответственно. Метилцитратсинтаза PrpC является ключевым ферментом метилцитратного цикла, который используется для энергопродукции при утилизации пропионил-КоА – основного продукта окисления жирных кислот с нечётным числом атомов углерода (Munoz-Elias et al., 2006).

В транскриптомном профиле ΔMcr11 экспрессия генов, кодирующих белки клеточной стенки или относящихся к процессам её формирования, была в основном снижена. К таким генам относятся *kasA* (синтез миколовых кислот), *ppsB* и *ppsA* (биосинтез фенолфтиоцерола и фтиоцеролдимикоцерозата), *pks1* (поликетидсинтаза), *ldtB* (синтез пептидогликана), *lprP* и *lpqS* (липопротеины), *rpfE* и *rpfA* (пептидогликангидролазы, факторы выхода из покоящегося состояния). Известно, что синтез компонентов клеточной стенки и экспрессия на её поверхности определённых белков и липидов определяет вирулентность *M. tuberculosis*. Так, семейство гидрофобных липидов фтиоцеролдимикоцерозатов является одним из основных факторов

вирулентности микобактерий туберкулеза (Augenstreich et al., 2020), кроме того, они защищают клетки *M. tuberculosis* от действия реактивных соединений азота, продуцируемых МФ, и модулируют ранний иммунный ответ на инфекцию (Rousseau et al., 2004). Поликетидсинтаза Pks1 принимает участие в синтезе фтиоцеролдимикоцерозата и фенол-гликолипида (Moolla et al., 2021).

Среди генов с пониженной экспрессией также присутствуют гены семейств PE\_PGRS и PE/PPE, ассоциированные с патогенностью и вирулентностью микобактерий. Снижена экспрессия генов, кодирующих ион-транспортирующие белки: транспорт ионов калия – *kdpA*, *B*, *C*, и магния – *mgtE*. Повышена экспрессия гена *kgtP*, отвечающего за транспорт дикарбоксилатов.

Изменяется экспрессия генов некоторых регуляторных белков, например, *trcR* и *trcS*, белков, связанных ответом на стресс, в том числе, альфа-кристаллина HspX, ферредоксина FdxA, и TB31.7, которые входят в состав регулона DosR. Повышение экспрессии гена *TB31.7* в транскриптомном профиле ΔMcr11 было очень заметным ( $\text{Log}_2\text{FC}=5.92$ ). Данный ген кодирует универсальный белок стрессового ответа, который регулирует рост микобактерий и, необходим для их перехода в персистирующее состояние (Drumm et al., 2009). TB31.7 взаимодействует с белком Rv1747 – АТФ-связывающим транспортёром, который экспортирует липоолигосахариды, и, по-видимому, регулирует его функцию (Drumm et al., 2009).

Максимальное повышение экспрессии зарегистрировано для гена Rv1733c ( $\text{Log}_2\text{FC}=6.17$ ). Rv1733c также входит в DosR-регулон и кодирует белок с неизвестной функцией, который отличается высокой иммуногенностью (Black et al., 2009; Leyten et al., 2006). Наряду с известными иммуногенными белками ESAT-6 и CFP-10, белок Rv1733c способен стимулировать выработку  $\gamma$ -ИНФ и интерлейкина-2 (IL-2) МФ, что используется для диагностики ТБ посредством квантиферонового теста (Zhang et al., 2022).

Таким образом, сравнение профиля транскрипции штамма ΔMcr11 с профилем транскрипции штамма wt указывает на значительные изменения в клетке *M. tuberculosis*. Так, наблюдается дифференциальная экспрессия генов, кодирующих белки-участники центральных метаболических процессов, белки-транспортеры различных молекул и ионов через цитоплазматическую мембрану и белки стрессового ответа. Кроме того, транскриптомный профиль ΔMcr11 указывает на активацию процессов ремоделирования клеточной стенки, подавления биосинтеза липидов – факторов вирулентности *M. tuberculosis* и изменение экспрессии белков семейств PE\_PGRS и PE/PPE, которые также определяют вирулентность *M. tuberculosis*.

#### 4. Изучение фенотипа штаммов $\Delta Mcr11$ , $\Delta DrrS$ , $\Delta\Delta Mcr11\_DrrS$ после пассирования *in vivo*

Результаты транскриптомного анализа штаммов с делецией малых РНК  $Mcr11$  и  $\Delta DrrS$  указывают на то, что они, возможно, регулируют экспрессию генов, определяющих вирулентность *M. tuberculosis*. Поэтому была поставлена задача восстановить вирулентный потенциал штаммов, полученных нами *in vitro*, который, как известно, может утрачиваться при их длительном культивировании в лаборатории (Converse et al., 2010). Нами было проведено восстановление вирулентности мутантных штаммов  $\Delta Mcr11$ ,  $\Delta DrrS$ ,  $\Delta\Delta Mcr11\_DrrS$  и штамма *wt* путем заражения ими мышей линии C57BL/6, резистентных к ТБ, с последующим высевом бактерий из гомогенатов селезёнок.

Оказалось, что штаммы с делецией малой РНК  $\Delta Mcr11$ , малой РНК  $\Delta DrrS$  и двух малых РНК  $\Delta\Delta Mcr11\_DrrS$  после пассирования *in vivo* были не способны расти на стандартной среде Сотона, отличительной чертой которой является достаточно высокая концентрация глицерина (6 об. %), и при этом хорошо росли на среде Миддлбрука с 0.5 об.% глицерина. Для штамма *wt* после пассирования *in vivo* заметной разницы в росте на этих двух средах не наблюдалось (рис. 6). В модифицированной среде Сотона (Сотон\_R) со сниженной в 10 раз концентрацией глицерина (0.6 об.%), рост всех мутантных штаммов возобновлялся после незначительно увеличенного лаг-периода (рис. 6). Подобный эффект угнетения роста на среде с высоким содержанием глицерина наблюдался и при росте мутантных штаммов на плотных питательных средах (рис. 7) и был особенно выражен для штамма  $\Delta\Delta Mcr11\_DrrS$ .

Анализ литературы показал, что торможение роста *M. tuberculosis* в присутствии высоких концентраций глицерина наблюдалось при делеции генов *Rv3679* и *Rv3680*, кодирующих белковый комплекс с АТФ-азной функцией (Whitaker et al., 2020), и, что особенно интересно, тоже проявлялся только после предварительного пассирования мутантных клеток *in vivo*.

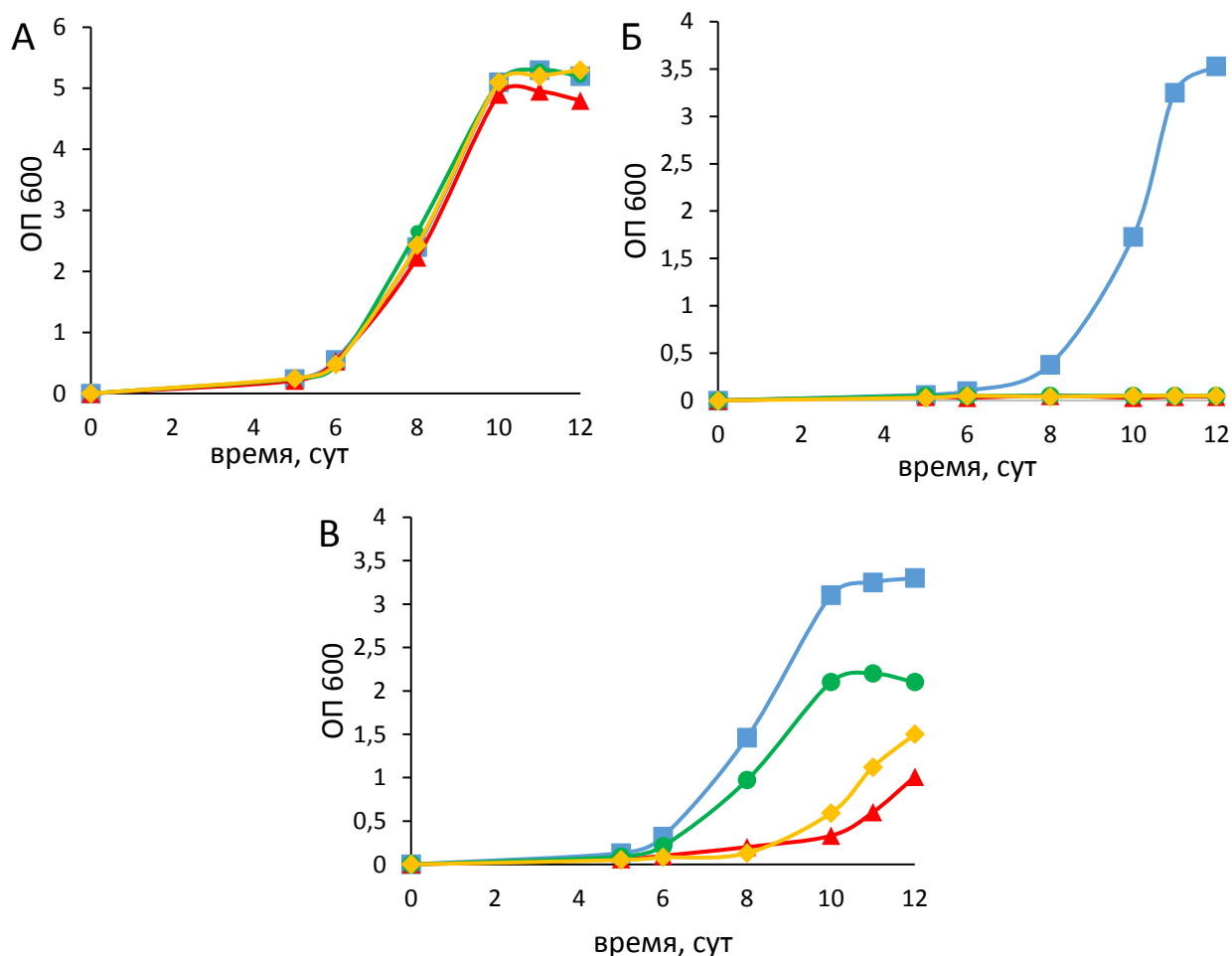


Рис. 6. Динамика роста штаммов с восстановленной вирулентностью на лабораторных средах различного состава после пассирования *in vivo*: среда Миддлбрука (А), среда Сотона (Б), среда Сотон\_R (В). Wt – синяя линия,  $\Delta$ Mcr11 – красная,  $\Delta$ DrrS – зелёная и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS – жёлтая.

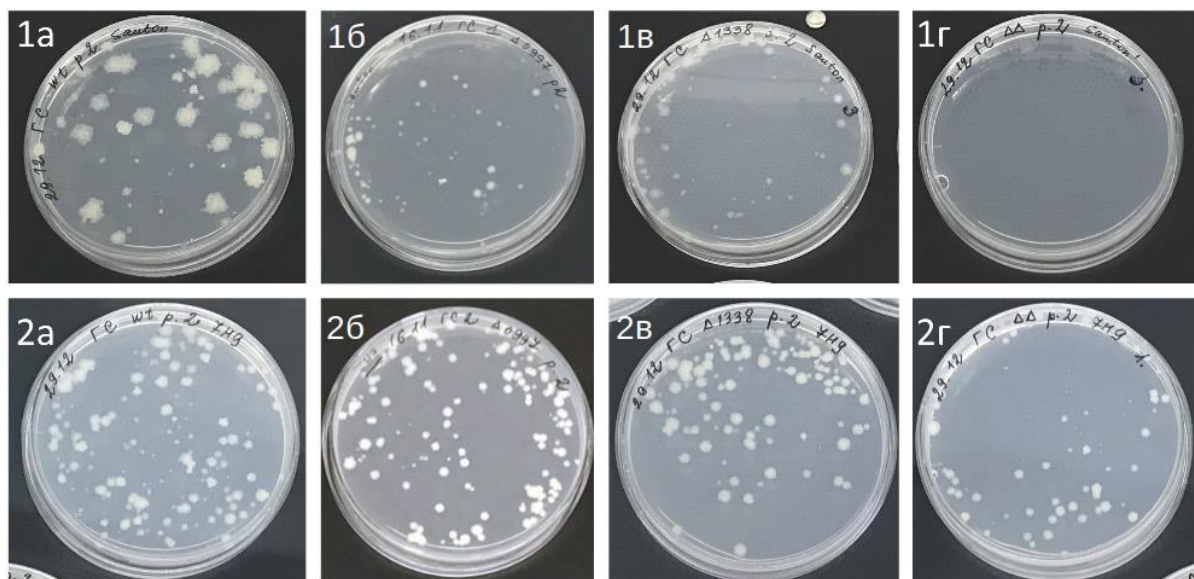


Рис. 7. Сравнение характера роста штаммов *M. tuberculosis* wt (а),  $\Delta$ Mcr11 (б),  $\Delta$ DrrS (в) и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS (г) на плотных средах: Сотона (1) и Миддлбрука (2).

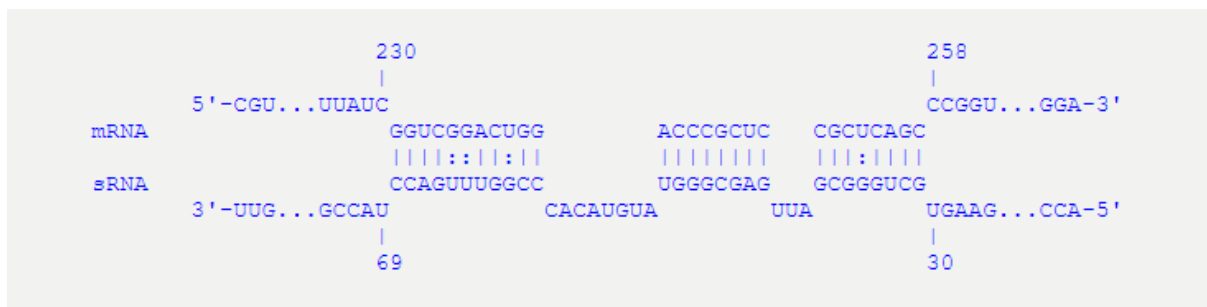


Рис. 8. Возможное связывание комплементарных оснований малой РНК DrrS и мРНК гена Rv3679 в предсказанном участке seed1.

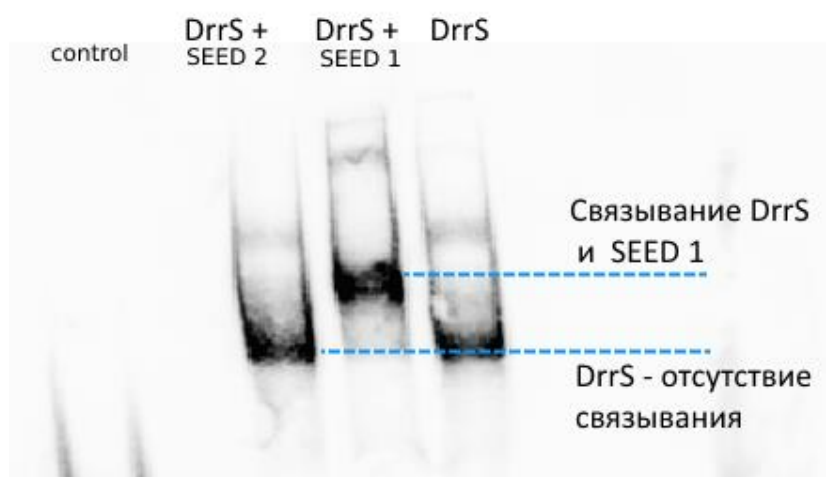


Рис. 9. Анализ изменения электрофоретической подвижности DrrS в присутствии фрагментов 5'-НТО мРНК гена Rv3679, содержащих потенциальные участки связывания seed1 и seed2.

Мы предположили, что гены Rv3679 и Rv3680 могут являться мишенями малых РНК DrrS и Mcr11. С помощью алгоритма CopraRNA было обнаружено, что в число 10 наиболее вероятных мишеней малой РНК DrrS входит ген Rv3679, который содержит два потенциальных участка связывания seed1 и seed2 в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК, и, следовательно, может являться мишенью DrrS. С помощью метода анализа сдвига электрофоретической подвижности было обнаружено, что DrrS действительно связывается с одним из предсказанных участков связывания seed1, что вызывает торможение подвижности DrrS в геле (рис. 9). Таким образом, мРНК гена Rv3679 является потенциальной мишенью малой РНК DrrS. Известно, что гены Rv3679 и Rv3680, находящиеся в одном опероне, кодируют белковый комплекс, регулирующий метаболизм глицерина (Whitaker et al., 2020). Следовательно, малая РНК DrrS может также принимать участие в регулировании метаболизма глицерина у *M. tuberculosis*.

## 5. Анализ эукариотического транскриптома инфицированных макрофагов

Был проанализирован транскриптомный ответ костномозговых макрофагов (КММФ) мыши, активированных  $\gamma$ -ИФН и зараженных изучаемыми штаммами. Методом RNA-seq были получены транскриптомные профили поли-А фракции РНК инфицированных мутантными штаммами КММФ через 24 часа после инфекции, и было проведено их сравнение с транскриптомным профилем КММФ, инфицированных штаммом wt. ДЭГ считались гены, для которых изменение уровня экспрессии  $|\text{Log}_2\text{FC}|$  было больше 1.

Наибольшее число ДЭГ – 119 – было обнаружено в КММФ при инфекции штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$ , тогда как инфицирование КММФ штаммами  $\Delta\text{DrrS}$  и  $\Delta\text{Mcr11}$  приводило лишь к незначительным изменениям в экспрессии (табл. 2).

Табл. 2. Число ДЭГ КММФ, заражённых мутантными штаммами *M. tuberculosis*, по отношению к КММФ, заражённых штаммом wt.

	$\Delta\text{DrrS}$	$\Delta\text{Mcr11}$	$\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$
Число генов с активацией экспрессии	14	8	91
Число генов с подавленной экспрессией	18	13	100
Суммарное число ДЭГ	32	21	191

Анализ транскриптома КММФ, инфицированных штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  по сравнению с транскриптомом КММФ, инфицированных штаммом дикого типа, проведенный с помощью базы данных STRING (Szklarczyk et al., 2023), обнаружил значительное число ДЭГ и существенную функциональную взаимосвязь между большинством из них (рис. 10). В целом, анализ транскриптомного массива данных КММФ, инфицированных мутантными штаммами, и в особенности штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$ , указывает на дисбаланс иммунных реакций хозяина, а именно: супрессию активации Т-клеточного ответа, изменение экспрессии цитокинов, нарушение процессов клеточного сигналинга и презентации антигенов, а также ингибирование матриксных металлопептидаз (ММП). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что клетки *M. tuberculosis* в отсутствие малых РНК Mcr11 и DrrS подавляют иммунные реакции макроорганизма на инфекцию, что в дальнейшем может усугублять тяжесть ее течения и приводить к преждевременной гибели организма-хозяина. То есть Mcr11 и DrrS выступают в роли регуляторов взаимодействия «патоген-хозяин», при отсутствии которых нарушается контроль инфекции *M. tuberculosis*.



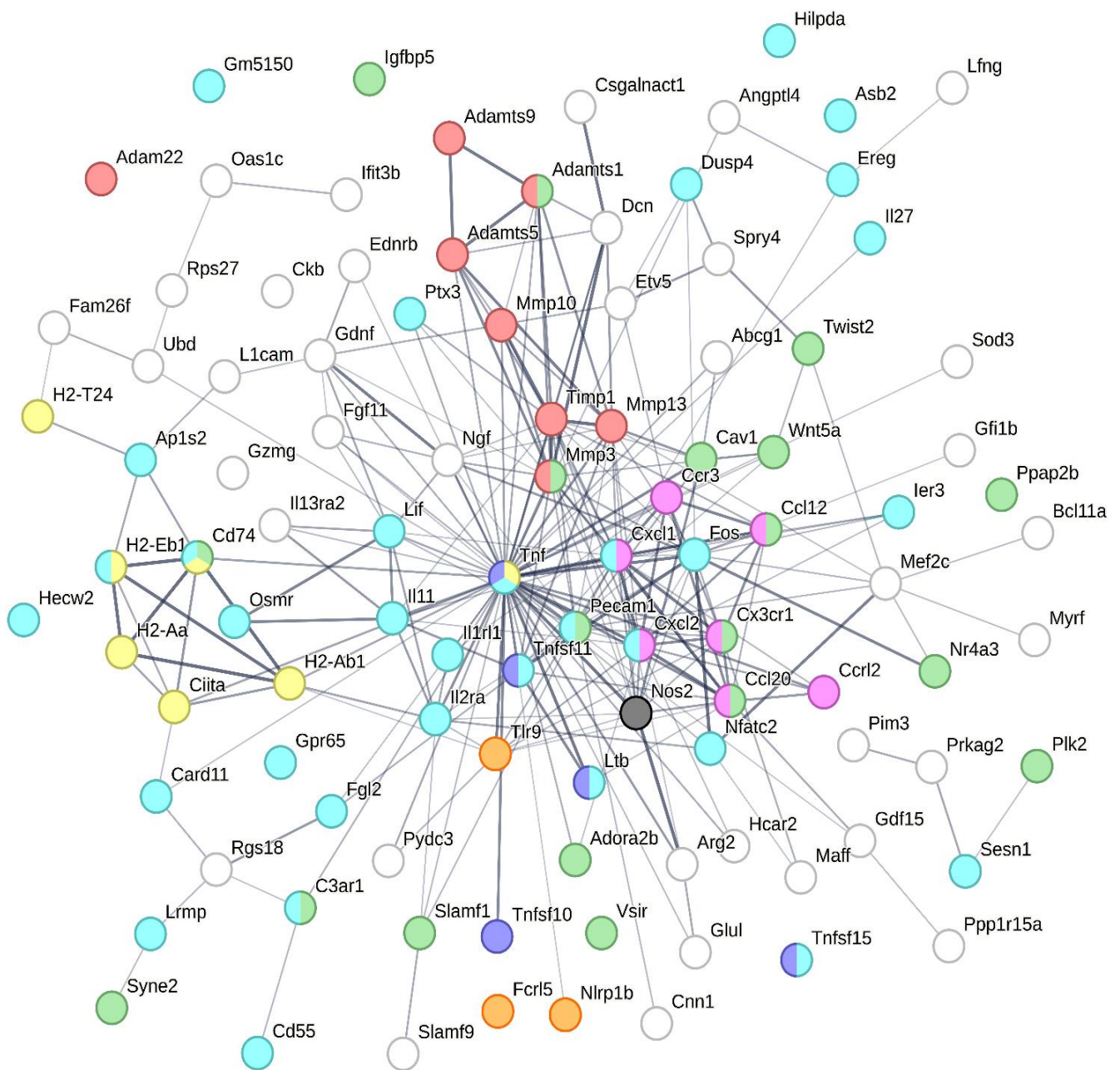


Рис. 10. Функциональная взаимосвязь между ДЭГ, обнаруженными в КММФ при инфекции штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$ . Каждому кружку соответствует один из ДЭГ. Линии между кружками обозначают наличие функциональной взаимосвязи (основано на ко-экспрессии генов в различных условиях, толщина линии отражает прочность взаимосвязи). Цветом обозначены ДЭГ, принадлежащие к одной функциональной группе: ФНО- $\alpha$  и его рецепторы – синий; ММП и их регуляторы – красный; хемокины и их рецепторы – розовый; процессинг и презентация антигенов – желтый; продукция интерлейкинов и их рецепторов – голубой; регуляция миграции клеток – зелёный; патоген-распознающие рецепторы – оранжевый; индуцируемая NO-синтаза – серый. На схеме представлены только ДЭГ, имеющие функциональную взаимосвязь друг с другом.

Транскриптом КММФ, инфицированных штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$ , представляет собой более широкий спектр ДЭГ по сравнению с транскриптами КММФ, инфицированных штаммами  $\Delta\text{Mcr11}$  и  $\Delta\text{DrrS}$ , что может указывать на функциональное взаимодействие этих двух малых РНК между собой и совместное регулирование процесса взаимодействия инфицированного макроорганизма и патогена, причем это совместное регулирование, по-видимому, более эффективно, чем регуляторное действие этих малых РНК по-отдельности.

## **6. Модель туберкулёзной инфекции мышей**

Чтобы оценить роль малых РНК в развитии инфекции *in vivo*, был проведён эксперимент по заражению восприимчивых к ТБ мышей линии I/St штаммами *M. tuberculosis*  $\Delta\text{Mcr11}$ ,  $\Delta\text{DrrS}$ ,  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  и wt с восстановленной вирулентностью. Для инфекции была использована доза  $10^6$  клеток/мышь, внутривенный тип заражения. Данный эксперимент был проведен совместно с ЦНИИ Туберкулеза. В результате эксперимента было обнаружено, что мыши, зараженные штаммами  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  и  $\Delta\text{Mcr11}$ , быстрее погибали от инфекции, чем мыши, зараженные штаммом wt, а мыши, зараженные штаммом  $\Delta\text{DrrS}$  отличались большей продолжительностью жизни (рис 11). То есть можно сделать вывод об увеличении вирулентности штаммов  $\Delta\text{Mcr11}$  и  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  и снижении вирулентности штамма  $\Delta\text{DrrS}$ .

Для подтверждения того, что наблюдаемый фенотип ускоренной гибели мышей для штамма  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  *M. tuberculosis* был связан с делецией малых РНК, совместно с коллегами из ИБХ РАН был создан штамм  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_comp}$  с комплементацией делеции обеих малых РНК с использованием вектора pMV306. Параллельно были созданы штамм дикого типа и штамм с двойной делецией, содержащие пустую плазмиду pMV306 (wt\_empty и  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_empty}$ , соответственно) для получения корректных отрицательного и положительного контроля. Эти штаммы были пассированы через резистентных к ТБ мышей для восстановления их вирулентного потенциала. Затем мыши чувствительной линии I/St были инфицированы тремя полученными штаммами в дозе  $10^6$  клеток/мышь с внутривенным типом заражения.

На рис. 12 показано, что мыши, инфицированные штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_comp}$ , в котором ранее утраченные гены малых РНК были восстановлены, отличались достоверно большей продолжительностью жизни по сравнению со штаммом  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_empty}$  без комплементации делеций, и эта продолжительность жизни была приближена к продолжительности жизни мышей, инфицированных штаммом дикого типа wt\_empty. Таким образом, в



результате комплементации делеций двух малых РНК Mcr11 и DrrS в штамме  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_comp}$  происходило «восстановление» фенотипа штамма дикого типа (рис. 12). Полученный результат наглядно показывает участие малых РНК DrrS и Mcr11 в регуляции биохимических процессов, связанных с взаимодействием патогена и организмом хозяина при инфекции.

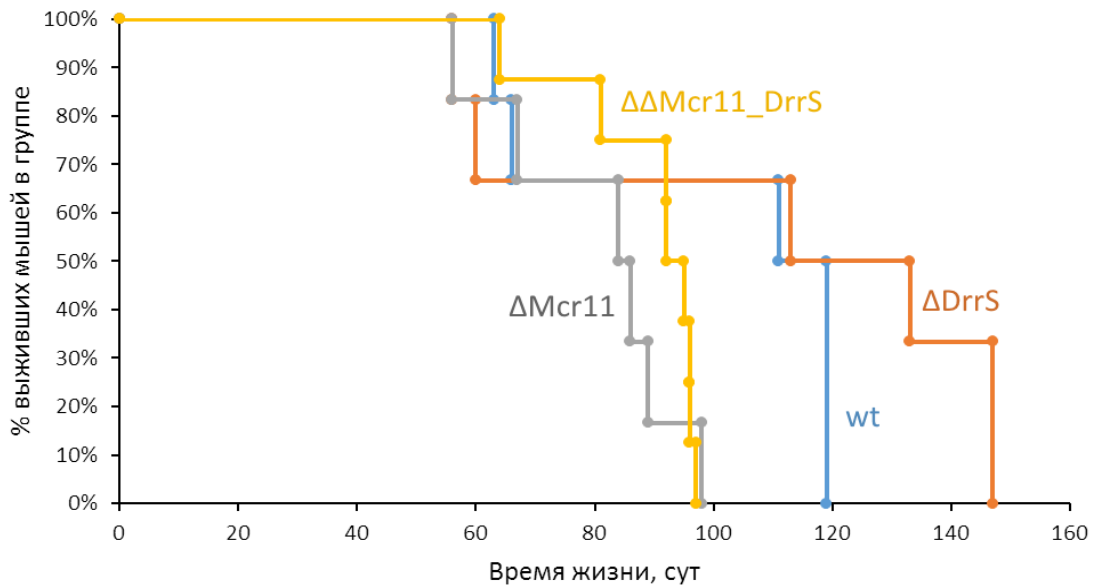


Рис. 11. Динамика гибели восприимчивых к ТБ мышей линии I/st после заражения штаммами  $\Delta\text{DrrS}$ ,  $\Delta\text{Mcr11}$ ,  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$  и wt.

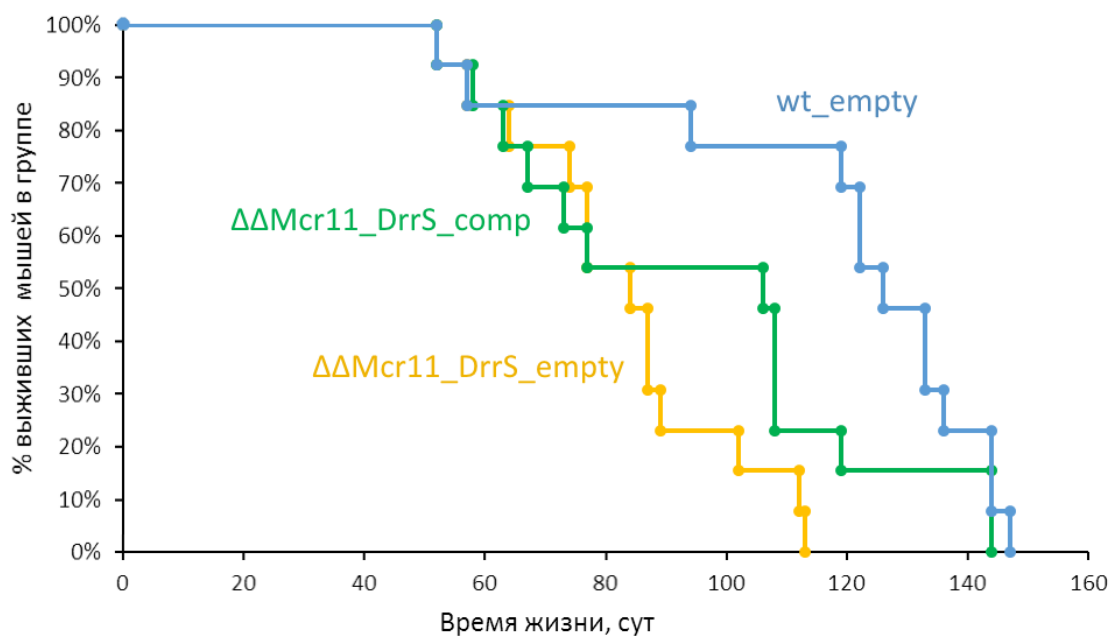


Рис. 12. Динамика гибели восприимчивых к ТБ мышей линии I/st после заражения штаммами *M. tuberculosis*  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_comp}$ ,  $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS\_empty}$  и wt\_empty.

## Заключение

Полученные результаты указывают на то, что изучаемые 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 влиять на характер течения инфекции организма-хозяина, модулируя его иммунный ответ.

## Выводы:

1. DrrS играет важную роль в формировании устойчивости клеток *M. tuberculosis* к перекисному, нитрозативному и кислотному стрессам и нехватке компонентов питания, и способствует их выживанию в макрофагах при фагоцитировании.

2. Анализ транскриптома штамма  $\Delta$ DrrS выявил угнетение центральных метаболических процессов (аэробного дыхания, синтеза АТФ и трансляции), а также переход на использование альтернативных акцепторов электронов в электрон-транспортной цепи. При этом активировался ключевой регулятор гипоксии DosR и гены контролируемого им DosR-регулона, а также маркёры окислительного и нитрозативного стресса.

3. Транскриптом штамма  $\Delta$ Mcr11 обнаружил активацию процессов ремоделирования клеточной стенки и подавления биосинтеза факторов вирулентности *M. tuberculosis*.

4. Инфекция костномозговых макрофагов мыши мутантными штаммами *M. tuberculosis* вызывает дисбаланс иммунных реакций макроорганизма, наиболее ярко выраженный в случае штамма  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 с делецией двух малых РНК.

5. Инфекция мышей штаммом *M. tuberculosis*  $\Delta$ DrrS приводит к увеличению времени жизни животных, а штаммами  $\Delta$ Mcr11 и  $\Delta\Delta$ DrrS\_Mcr11 – к сокращению времени жизни животных по сравнению с временем их жизни при инфекции штаммом дикого типа.

6. Малые РНК DrrS и Mcr11 вовлечены в процессы метаболической адаптации *M. tuberculosis* при инфекции и модуляцию иммунного ответа макроорганизма.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в 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