

УДК 579.69

## МАЛЫЕ РНК Mcr11 И DrrS *Mycobacterium tuberculosis* КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИЦЕРИНА

© 2022 г. А. А. Острик<sup>1</sup>, \*, А. С. Григоров<sup>2</sup>, И. В. Бочарова<sup>3</sup>,  
А. С. Капрельянец<sup>1</sup>, Т. Л. Ажикина<sup>2</sup>, Е. Г. Салина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

<sup>3</sup>Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва 107564 Россия

\*e-mail: albina.ostrik@gmail.com

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Изучали роль малых некодирующих РНК Mcr11 и DrrS и их возможную синергию в метаболизме *Mycobacterium tuberculosis*. При выращивании на стандартных средах заметных различий в динамике роста как штаммов с однократной делецией малых РНК ΔMcr11 и ΔDrrS, так и штамма с двойной делецией ΔΔMcr11\_DrrS по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* дикого типа выявлено не было. Однако, после пассирования *in vivo* этих штаммов в мышах линии В6, мутантные штаммы характеризовались угнетением роста *in vitro* на среде Сотона с высоким содержанием глицерина (6% об.), более выраженным у штамма с двойной делецией. Как известно, торможение роста в присутствии высоких концентраций глицерина у клеток *M. tuberculosis* вызывала делеция генов Rv3679-3680, которое было обусловлено накоплением токсичного метаболита метилглиоксаля. Согласно биоинформатическим расчетам, мРНК гена Rv3679 содержит два потенциальных участка связывания с малой РНК DrrS в 5'-нетранслируемой области, и, следовательно, является ее потенциальной мишенью. При этом Rv3679 не содержит потенциальных участков связывания с малой РНК Mcr11, однако ее делеция также ухудшает рост клеток *M. tuberculosis* на средах с высоким содержанием глицерина, что указывает на общность регуляторного действия малых РНК DrrS и Mcr11 с возникновением синергического эффекта в развитии “глицериновой токсичности” у штамма ΔΔMcr11\_DrrS. Таким образом, малые РНК Mcr11 и DrrS принимают участие в регуляции метаболизма глицерина *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, персистенция, вирулентность, малые некодирующие РНК, регуляция трансляции, метаболизм глицерина

DOI: 10.31857/S0555109922040134

Малые некодирующие РНК, осуществляющие посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов в клетках бактерий, действуют как преобразователи сигналов окружающей среды и контролируют транскрипцию, трансляцию и стабильность целевых мРНК в ответ на изменение внешних условий [1–4]. Особенно интересна роль малых некодирующих РНК у патогенных бактерий, поскольку существует ряд указаний на их участие во взаимодействии с иммунной системой организма-хозяина и сохранении жизнеспособности бактерий в условиях стрессового воздействия [1, 5].

Одной из наиболее распространенных в мире инфекций человека является туберкулез, уносящий ежегодно свыше 8 миллионов человеческих жизней [6]. В настоящее время у *M. tuberculosis* с

помощью биоинформатических подходов выявлено несколько сотен потенциальных малых регуляторных РНК, при этом присутствие некоторых из них подтверждено экспериментально [4, 5, 7–9]. Механизм регуляторного действия, однако, установлен лишь для крайне небольшого числа [4, 10].

Особое внимание исследователей привлекают малые некодирующие РНК *M. tuberculosis*, индуцируемые во время инфекции, поскольку изучение их функции может существенно углубить понимание механизмов патогенеза туберкулезной инфекции. Ранее было обнаружено, что малые некодирующие РНК Mcr11 и DrrS интенсивно экспрессируются в моделях хронической инфекции мышей, и сравнимы с уровнем транскрипции

16S рРНК [11, 12], что позволяет предположить, что они участвуют в ответе на стрессовое воздействие, которое микобактерии испытывают после фагоцитоза в организме хозяина. Малые РНК Mcr11 и DrrS присутствуют только у патогенных видов микобактерий туберкулезного комплекса, способных вызывать туберкулез у человека и животных. Они имеют стабильную вторичную структуру и высоко консервативны [7]. Впервые они были обнаружены в результате полнотранскриптомного анализа *M. tuberculosis* методом RNA-seq и подтверждены Нозерн-блоттингом [11]. Позднее нами было показано, что гиперэкспрессия этих малых РНК в клетках *M. tuberculosis* приводит к замедлению роста патогена в стандартных условиях *in vitro* [13].

Экспрессия малой РНК Mcr11 зависит от фазы роста микобактерий, а также от условий выращивания. Показано, что уровень экспрессии повышается при недостатке питательных веществ и снижается при выращивании в среде с кислым рН [14], что указывает на ее возможную роль в процессах адаптации к стрессовым условиям. Mcr11 функционально связана со смежными генами – Rv1264 и Rv1265. Rv1265 кодирует ДНК-, АТФ-связывающий белок, увеличивающий экспрессию Mcr11 в стационарной фазе роста [15]. Предполагаемыми мишенями Mcr11 являются мРНК генов Rv3282, *fadA3*, и *lipB*, вовлеченных в метаболизм липидов [16]. При выращивании *M. tuberculosis* и *M. bovis* в среде без источников жирных кислот штаммы с делецией малой РНК Mcr11 показывали отставание в росте.

Малая РНК DrrS является очень стабильным транскриптом, время полужизни которого составляет 6 ч, ее экспрессия функционально связана с регулоном DosR, активирующемся при стрессовом воздействии оксида азота, кислородных радикалов и при гипоксии [17]. Недавно удалось показать, что гиперэкспрессия DrrS в клетках *M. tuberculosis* приводила к повышению устойчивости бактерий к стрессовым воздействиям [18]. В логарифмической фазе роста такие бактерии сохраняли более высокую метаболическую активность в условиях повышенного окислительного стресса, голодания, продукции оксида азота или при понижении рН среды. Гиперэкспрессия DrrS повышала выживаемость микобактерий при фагоцитировании их макрофагами в экспериментах по инфицированию клеточной линии ТНР-1, тогда как гиперэкспрессия Mcr11 несущественно сказывалась на выживаемости *M. tuberculosis* в этих условиях [18]. Кроме того, показано, что в макрофагах, активированных  $\gamma$ -интерфероном, экспрессия DrrS повышается [19], что указывает на ее роль в патогенезе *M. tuberculosis*.

Полученные данные указывают на вероятную роль малых РНК Mcr11 и DrrS в адаптации *M. tu-*

*berculosis* к персистенции внутри макроорганизма и их участию во взаимодействии “патоген-хозяин”.

Цель работы – изучение роли малых некодирующих РНК Mcr11 и DrrS и их возможной синергии в метаболизме *M. tuberculosis*.

## МЕТОДИКА

**Культивирование бактерий.** Бактерии *M. tuberculosis* штамм H37Rv (“ЦНИИ Туберкулеза”, Россия) выращивали в жидкой среде Сотона (г/л дистиллированной воды): L-аспарагин – 4.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.5,  $\text{MgSO}_4$  – 1.4, железо лимоннокислое аммиачное – 0.05, натрий лимоннокислый трехзамещенный – 2.0,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.1, глицерин – 60 мл, рН 7.2; а также в жидкой среде Сотон\_R со сниженной концентрацией глицерина (г/л дистиллированной воды): L-аспарагин – 2.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.25,  $\text{MgSO}_4$  – 0.7, железо лимоннокислое аммиачное – 0.025, натрий лимоннокислый трехзамещенный – 1.0,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.05, глицерин – 6 мл, рН 7.2. Для выращивания также использовали жидкую среду Миддлбрука (7H9, “HiMedia”, Индия) в присутствии ростовой добавки альбумин-декстроза-каталаза (АДК, “HiMedia”, Индия), 0.05% твин-80 при 37°C и перемешивании (200 об./мин). Культивирование на плотных средах проводили в статическом режиме без добавления твин-80.

**Пассирование мутантных штаммов *in vivo*.** Мутантные штаммы *M. tuberculosis* с делецией генов малой РНК MTS0997 и MTS1338 были получены по методике, описанной в статье [20].

Делеция генов была подтверждена полногеномным секвенированием. Данные о мутантных штаммах содержатся в базе данных NCBI (идентификатор проекта: PRJNA701202). Для восстановления вирулентности мутантных штаммов с делецией малой РНК DrrS ( $\Delta\text{DrrS}$ ), малой РНК Mcr11 ( $\Delta\text{Mcr11}$ ) штамма с двойной делецией малых РНК Mcr11 и DrrS ( $\Delta\Delta\text{Mcr11\_DrrS}$ ), полученных *in vitro*, и штамма дикого типа (wt) клетки выращивали в стандартных условиях культивирования на среде Сотона с добавлением АДК и 0.05% твина-80 до ОП = 1, отмывали от среды и ресуспендировали в физиологическом растворе. Полученную суспензию использовали для заражения мышей линии C57BL/6Ycit (B6), резистентных к туберкулезу, с целью восстановления вирулентных свойств бактерий *M. tuberculosis* (доза  $10^5$  бактерий/мышь, внутривенный способ инфицирования).

Мыши содержались в обычных условиях в виварии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза (Россия) в соответствии с рекомендациями Минздрава России № 755. Для эксперимента использовали самок мышей в возрасте 2.5–3.0 мес. Экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по биоэтике Цен-

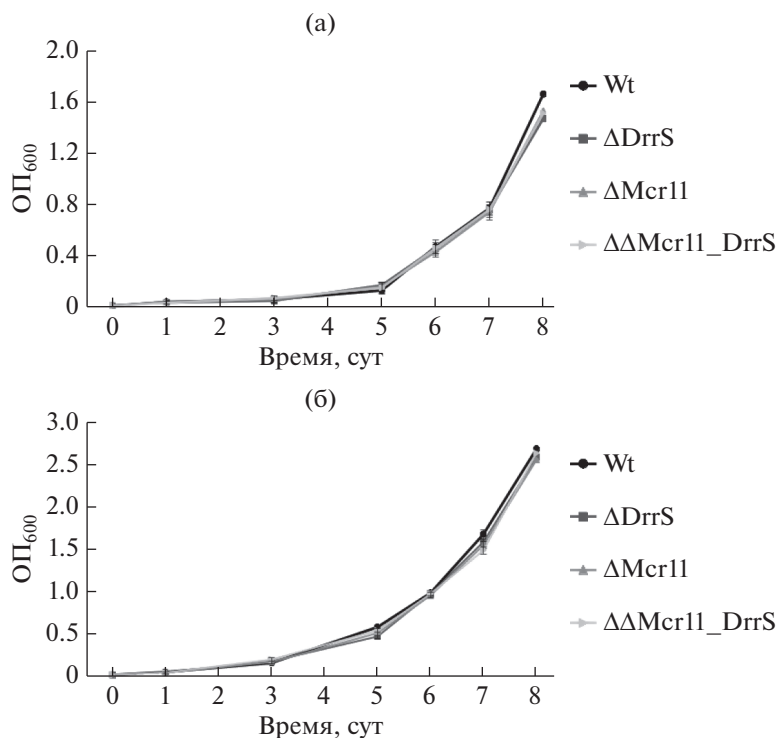


Рис. 1. Динамика роста штаммов wt, ΔMcr11, ΔDrrS и ΔΔMcr11\_DrrS *M. tuberculosis* на средах Сотона (а) и Миддлбрука (б).

трального научно-исследовательского института туберкулеза. Через 21 сут после инфицирования мышей выводили из эксперимента, готовили гомогенаты селезенки и высевали их на плотные питательные среды Сотона и Миддлбрука в присутствии АДК.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили с помощью *t*-теста Стьюдента. За статистически достоверные принимались значения с  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании бактерий в жидкой среде Сотона с добавлением ростовой добавки АДК и твин-80 *in vitro* было обнаружено, что кривая роста штамма ΔΔMcr11\_DrrS была аналогична кривым роста штаммов с однократной делецией малых РНК ΔMcr11 и ΔDrrS, и кривой роста штамма дикого типа H37Rv, взятого в качестве контроля (рис. 1). Также не наблюдалось различий в динамике роста указанных штаммов в жидкой среде Миддлбрука с добавлением ростовой добавки АДК и твин-80. Таким образом, при росте на стандартных средах заметных различий в динамике роста как штаммов с однократной делецией малых РНК ΔMcr11 и ΔDrrS, так и штамма с двойной делецией ΔΔMcr11\_DrrS по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* дикого типа выявлено не было.

При высевах гомогенатов селезенки зараженных мышей линии В6, резистентных к туберкулезу, на плотную питательную среду Сотона с ростовой добавкой АДК и параллельно на среду Миддлбрука с ростовой добавкой АДК, было обнаружено, что, несмотря на идентичный характер роста на среде Миддлбрук + АДК, характер роста штаммов на среде Сотон + АДК был неодинаковым. На плотной среде Сотона у штаммов ΔΔMcr11\_DrrS, ΔMcr11 и ΔDrrS наблюдали торможение роста, более выраженное у штамма с двойной делецией, у которого рост почти полностью отсутствовал (рис. 2). Колонии, полученные после высева гомогенатов селезенки инфицированных мышей линии В6, были пересеваны на жидкую среду для дальнейшей дифференциации. Оказалось, что штаммы с делецией малой РНК ΔMcr11 и малой РНК ΔDrrS, а также двух малых РНК ΔΔMcr11\_DrrS после пассирования *in vivo* были не способны расти на стандартной среде Сотон + АДК с твином (рис. 3а), и при этом хорошо росли на среде Миддлбрук + АДК с твином (рис. 3б). Для штамма дикого типа заметной разницы в росте на этих двух средах не наблюдалось.

Основным отличием в составе сред является различная концентрация глицерина, которая в среде Сотона составляла 6 об. %, а в среде Миддлбрука — всего 0.5 об. %. В связи с этим, было выдвинуто предположение о токсичном воздействии глицерина на рост штаммов с делецией малых РНК ΔMcr11, ΔDrrS и ΔΔMcr11\_DrrS. Действительно,

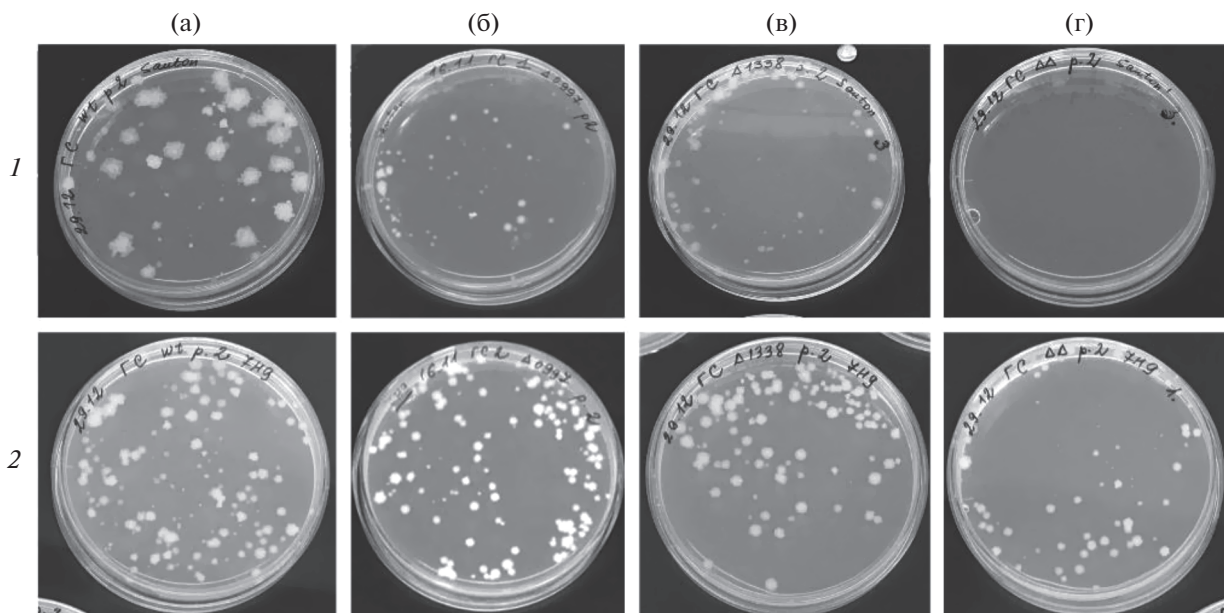


Рис. 2. Рост штаммов *M. tuberculosis* после высева из гомогенатов селезенки инфицированных мышей линии В6 на плотной среде Сотона (1) и Миддлбрука (2); а – дикий тип, б –  $\Delta$ Mcr11, в –  $\Delta$ DrrS, г –  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS.

при выращивании штаммов в среде Сотона со сниженной в 10 раз концентрацией глицерина (0,6%, среда Сотон\_R) рост штамма  $\Delta$ DrrS возобновлялся после незначительно увеличенного лаг-периода (рис. 4). При выращивании штаммов  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS и особенно  $\Delta$ Mcr11 на среде Сотон\_R наблюдали значительно увеличенный лаг-период (рис. 4). Однако позднее рост также возобновлялся.

Анализ литературы показал, что подобное торможение роста *M. tuberculosis* на плотных питательных средах в присутствии высоких концентраций глицерина наблюдалось при делеции генов Rv3679-3680, кодирующих белковый комплекс с АТФ-азной функцией [21], и, что особенно интересно, оно тоже проявлялось только после пассирования мутантных клеток *in vivo*. Авторы исследования показали, что при понижении концентрации глицерина в среде рост мутантных штаммов восстанавливался, подобно тому, как это было в наших экспериментах с мутантными штаммами  $\Delta$ Mcr11,  $\Delta$ DrrS и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS.

Малые РНК, как известно, часто осуществляют регуляторную функцию посредством связывания с мРНК гена-мишени, что ингибирует или активирует его трансляцию. Была поставлена задача поиска возможного связывания малых РНК Mcr11 и DrrS с мРНК генов Rv3679 и Rv3680. Согласно биоинформатическим расчетам, мРНК гена Rv3679 в 5'-нетранслируемой области действительно содержит 2 потенциальных участка связывания

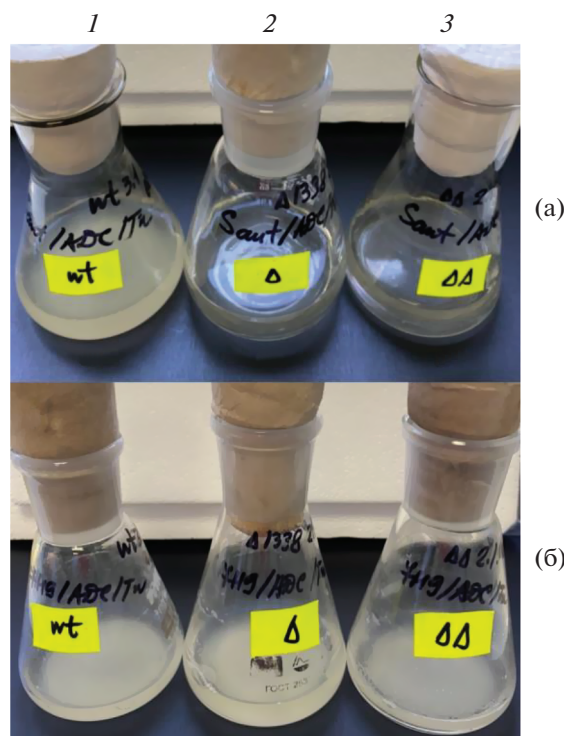
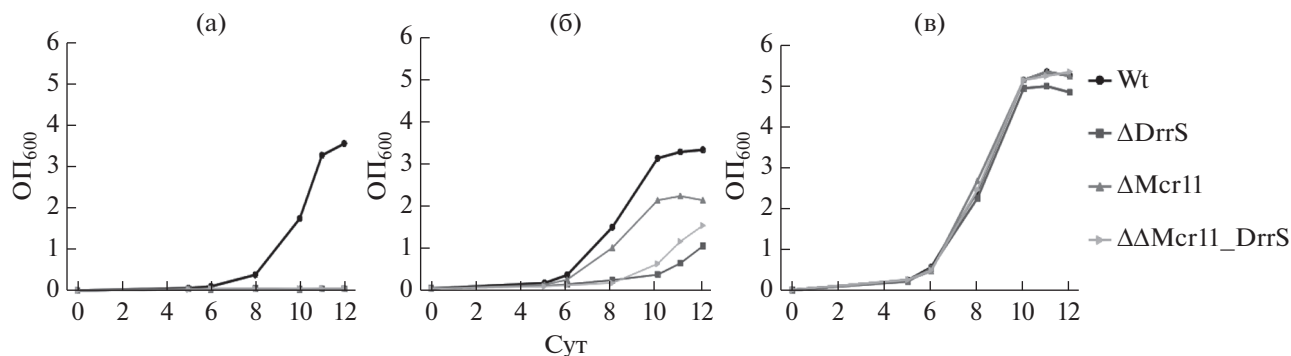


Рис. 3. Культивирование штаммов *M. tuberculosis* с восстановленной вирулентностью на жидкой среде Сотона (а) и на среде Миддлбрука (б) в присутствии ростовой добавки АДК и 0,05% твина-80 в течение 7 дней культивирования: 1 – дикий тип, 2 –  $\Delta$ DrrS, 3 –  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS.



**Рис. 4.** Динамика роста штаммов wt,  $\Delta$ Mcr11,  $\Delta$ DrrS и  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS *M. tuberculosis* с восстановленной вирулентностью на различных средах с АДК и 0.05% твин-80: а – среда Сотона, б – среда Сотона со сниженной концентрацией глицерина (Сотон\_Р), в – среда Миддлбрука

вания с малой РНК DrrS, но не с малой РНК Mcr11 (Григоров А.С, персональное сообщение на основании алгоритма CopraRNA <https://rna.informatik.uni-freiburg.de>), что позволило предположить, что Rv3679 может являться мишенью DrrS, а DrrS является регулятором глицеринового метаболизма *M. tuberculosis*. При этом мРНК гена Rv3679 не содержит потенциальных участков связывания с малой РНК Mcr11, однако ее делеция также ухудшает рост клеток *M. tuberculosis* на средах с высоким содержанием глицерина, при этом торможение роста на средах с высоким содержанием глицерина особенно ярко проявляется у штамма с двойной делецией  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS (рис. 2б, 4). Полученный результат, по все вероятности, указывает на возникновение синергического эффекта в развитии “глицериновой токсичности” у штамма  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS *M. tuberculosis*. Подобный синергический эффект был ранее отмечен у другого внутриклеточного бактериального патогена *Legionella pneumophila*. Примечательно, что делеция двух малых РНК *rsmY* и *rsmZ* приводила к резкому снижению вирулентности клеток штамма  $\Delta\Delta$ rsmYZ *L. pneumophila* и их способности к внутриклеточному росту в макрофагах, тогда как делеция малых РНК *rsmY* и *rsmZ* по-отдельности не оказывала заметного влияния на вирулентность патогена [22].

Полученные нами результаты открывают перспективы дальнейшего изучения двух малых некодирующих РНК Mcr11 и DrrS *ex vivo* и *in vivo* и их регуляторной роли в метаболизме глицерина *M. tuberculosis* и накопления токсических метаболитов с целью поиска новых антибиотических веществ, использующих возможности клеточного суицида для уничтожения опасного патогена.

*Заявление о работе в соответствии с международными Правилами работы с животными*

Исследования на лабораторных мышах линии В6 проводили в строгом соответствии с этически-

ми нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

А.А. Острик и Е.Г. Салина благодарят РФФИ (проект № 20-34-90015) за финансовую поддержку работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holmqvist E., Wagner E.G.H. // Biochem. Soc. Trans. 2017. V. 45. P. 1203–1212.
2. Papenfort K., Vogel J. // Cell Host Microbe. 2010. V. 8. P. 116–127.
3. Waters L.S., Storz G. // Cell 2009. V. 136. № 4. P. 615–628.
4. Schwenk S., Arnvig K.B. // Pathog. Dis. 2018. V. 76. № 4. P. 1–12.
5. Haning K., Cho S.H., Contreras L.M. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 1–11.
6. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
7. DiChiara J.M., Contreras-Martinez L.M., Livny J., Smith D., McDonough K.A., Belfort M. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. № 12. P. 4067–4078.
8. Ignatov D.V., Malakho S., Majorov K.B., Skvortsov T., Apt A.S., Azhikina T.L. // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 9. e74209.
9. Tsai C.-H., Baranowski C., Livny J., McDonough K.A., Wade J.T., Contreras L.M. // PLoS One. 2013. V. 8. № 11. e79411.
10. Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. // Успехи биологической химии 2021. Т. 61. С. 229–252.
11. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T.T., Parkhill J., Dougan G., Young B.Y. // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 11. P. 1–16.
12. Игнатов Д.В., Логунова Н.Н., Ажикина Т.Л. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. С. 253–256.

13. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 1–13.
14. Pelly S., Bishai W.R., Lamichhane G. // Gene. 2012. V. 500. № 1. P. 85–92.
15. Girardin R.C., Bai G., He J., Sui H., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2018. V. 110. № 5. P. 811–830.
16. Girardin R.C., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. № 2. P. 504–520.
17. Moores A., Riesco A.B., Schwenk S., Arnvig K.B. // PLoS One. 2017. V. 12. № 3. P. 1–27.
18. Острик А.А., Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., Гризоров А.С., Быченко О.С., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 336–341.
19. Salina E.G., Grigorov A.S., Skvortsova Y.V., Majorov K.B., Bychenko O.S., Ostrik A.A., Logunova N.N., Ignatov D.V., Kaprelyants A.S., Apt A.S., Azhikina T.L. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 474304.
20. Parish T., Stoker N.G.J. // Bacteriol. 2000. V. 182. № 20. P. 5715–5720.
21. Whitaker M., Ruecker N., Hartman T., Klevorn T., Andres J., Kim J., Rhee K., Ehrst S. // Bacteriol. 2020. V. 16. P. e00202–20
22. Sahr T., Brüggemann H., Jules M., Lomma M., Albert-Weissenberger C., Cazalet C., Buchrieser C. // Mol. Microbiol. 2009. V. 72. № 3. P. 741–762.

### Small RNAs Mcr11 and DrrS of *Mycobacterium tuberculosis* as Possible Regulators of Glycerol Metabolism

A. A. Ostrik<sup>a,\*</sup>, A. S. Grigorov<sup>b</sup>, I. V. Bocharova<sup>c</sup>, A. S. Kaprelyants<sup>a</sup>, T. L. Azhikina<sup>b</sup>, and E. G. Salina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

<sup>c</sup> Central Institute for Tuberculosis, Moscow, 107564 Russia

\*e-mail: albina.ostrik@gmail.com

The role of small non-coding RNAs Mcr11 and DrrS with its possible synergy in the metabolism of *M. tuberculosis* was studied. There were no noticeable differences in the growth dynamics of both strains with a single deletion of small RNAs  $\Delta$ Mcr11 and  $\Delta$ DrrS and a strain with a double deletion  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS compared to the wild-type *M. tuberculosis* strain during growth on standard media *in vitro*. However, it was found that after virulence restoration of these strains by *in vivo* passage through B6 mice, they showed a growth defect on Sauton's medium with a high content of glycerol (6 vol. %) *in vitro*, more pronounced in the strain with a double deletion. As it is known, growth inhibition in the presence of high concentrations of glycerol in *M. tuberculosis* cells was caused by the deletion of the Rv3679–3680 genes, which was due to the accumulation of the toxic metabolite methylglyoxal. According to bioinformatic predictions, the mRNA of the Rv3679 gene in the 5'-untranslated region contains 2 potential binding sites for the DrrS, but not for the Mcr11, suggesting that Rv3679 may be a DrrS target. The obtained result may indicate a common regulatory activity for small RNAs DrrS and Mcr11 of *M. tuberculosis* with the occurrence of a synergistic effect in the development of “glycerol toxicity” in the  $\Delta\Delta$ Mcr11\_DrrS strain. Thus, small RNAs Mcr11 and DrrS are involved in the regulation of *M. tuberculosis* glycerol metabolism pathways.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, persistence, virulence, small non-coding RNA, regulation of translation, glycerol metabolism