

УДК 577.21,579.873.21,579.258

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АПТАМЕРОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МАЛОЙ РНК *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MTS1338 В ИНФИЦИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ

© 2020 г. О. С. Быченко^{1,*}, Ю. В. Скворцова¹, А. С. Григоров¹, Т. Л. Ажикина¹

Представлено академиком РАН С. А. Лукьяновым

Поступило 19.03.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принято к публикации 16.04.2020 г.

На примере малой РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 впервые визуализирована субклеточная локализация малой некодирующей бактериальной РНК в инфицированных макрофагах. Исследуемая малая РНК была экспрессирована в микобактериях в виде модуля с РНК-аптамером, способным связывать флуорофор и активировать его флуоресценцию. Созданным микобактериальным трансформантом инфицирована клеточная линия макрофагов. Обработка инфицированных макрофагов флуорофором DFHBI-1T позволила детектировать флуоресценцию РНК модуля MTS1338-аптамер как непосредственно в микобактериях, так и в цитоплазме инфицированных макрофагов. Данная система важна в исследованиях по выявлению роли малых РНК *M. tuberculosis* в патогенезе туберкулеза, процессов их секреции, поиска эукариотических мишеней, а также молекулярных путей, на которые могут оказывать воздействие эти малые РНК.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, малые некодирующие РНК, MTS1338, Broccoli-аптамер, инфекция

DOI: 10.31857/S2686738920040095

Малые некодирующие РНК бактерий модулируют широкий спектр физиологических ответов и регулируют ключевые этапы жизнедеятельности у целого ряда возбудителей заболеваний [1, 2]. В последнее время обсуждается идея о том, что малые РНК внутриклеточных патогенных бактерий могут не только адаптировать собственный транскриптом под меняющиеся условия, но также взаимодействовать с транскриптомом инфицированного организма, вмешиваясь тем самым в процессы антибактериальной защиты. Выявление и исследование молекулярных цепей адаптации патогенных бактерий к иммунной защите хозяина при персистенции в макрофагах представляет собой важную научную проблему.

В данной работе исследуется малая некодирующая РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338, которая специфична только для микобактерий туберкулезного комплекса, и уровень ее экспрес-

сии *in vivo* чрезвычайно высок и составляет приблизительно 10^{-1} относительно уровня экспрессии 16S rRNA [3]. Ранее было показано, что MTS1338 вносит существенный вклад во взаимодействие *M. tuberculosis* с макрофагами, адаптируя бактериальный транскриптом к агрессивной внутримакрофагальной среде. Изменения в метаболизме бактерий, вызываемые гиперэкспрессией этой малой РНК, приводят к модуляции иммунного ответа [4].

Существуют примеры того, как некодирующие бактериальные РНК внутриклеточных патогенов могут секретироваться в цитоплазму инфицированных клеток и модулировать иммунный ответ во время инфекции [5, 6]. Предполагается, что малая РНК *M. tuberculosis* MTS1338 также может секретироваться и влиять на защитные клетки иммунной системы. Для изучения этого процесса востребована система визуализации малых РНК бактерий с помощью флуоресцентной микроскопии.

Общий подход для визуализации исследуемой РНК в клетке — экспрессия этой РНК совместно с РНК-аптамером, способным связывать небольшую молекулу-флуорофор и активировать ее флуоресценцию (так называемая модульная

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: bychenko.oksana@gmail.com

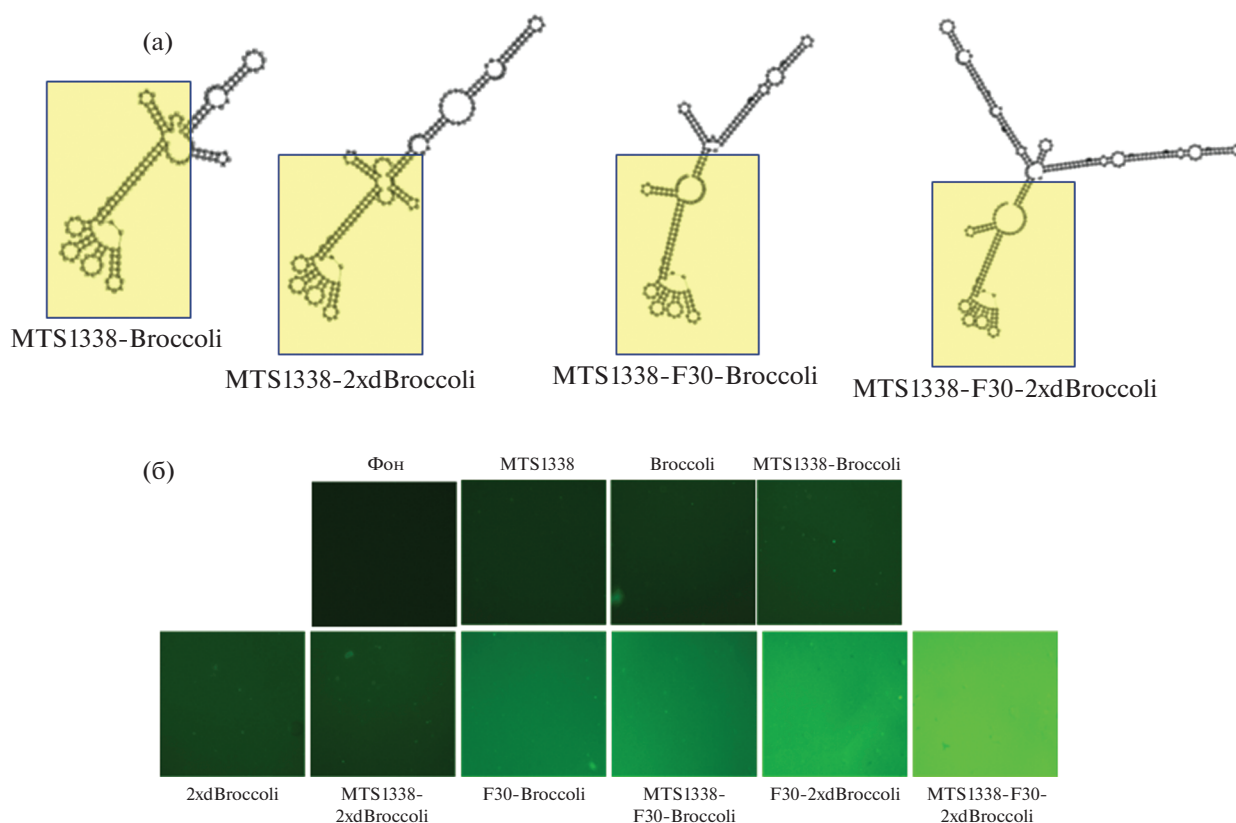


Рис. 1. (а) Вторичная структура РНК модулей MTS1338_Broccoli, MTS1338_2xdBroccoli, MTS1338_F30-Broccoli, MTS1338_F30-2xdBroccoli согласно серверу RNAfold. Часть модуля, соответствующая MTS1338, выделена прямоугольником. (б) Флуоресценция модульных РНК *in vitro*. Модульные РНК (100 нг) фракционировали в 6% полиакриламидном геле, инкубировали гель в растворе флуорофора (10 мкМ DFHBI-1T, 40 мМ HEPES pH 7.4, 100 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂) и анализировали с помощью флуоресцентного визуализатора ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) с использованием зеленого канала прибора.

РНК) [7]. Добавляя флуорофор в среду инкубирования клеток, экспрессирующих модульную РНК, мы имеем возможность определить клеточную локализацию малой РНК. Изначально методика была основана на использовании в качестве аптамера РНК, связывающую из раствора зеленый флуоресцентный белок (GFP) [8], однако для этой и других подобных методик требуется ко-экспрессия флуоресцентных белков в клетке, что может привести к неспецифической флуоресценции белков, не связавшихся с РНК [7]. В альтернативной стратегии используются последовательности РНК, которые благодаря своей особой третичной структуре способны связывать из раствора непосредственно саму молекулу-флуорофор и активировать ее флуоресценцию [9]. Как было показано Paige с соавторами [10], структурный аналог GFP, флуорофор DFHBI, (Z)-4-(3,5-difluoro-4-гидроксибензильдене)-1,2-диметил-1H-имидазол-5(4H)-он, не вызывал неспецифическую флуоресценцию при его активации различными компонентами клеток, такими как клеточная РНК или ДНК. Среди последовательностей

РНК-аптамеров хорошо зарекомендовала себя т.н. Broccoli, а также ее производные. Broccoli достаточно короткая (49 п.н.), обладает стабильной вторичной структурой, формирование которой мало зависит от биохимического состава среды, а также имеет яркую зеленую флуоресценцию при взаимодействии с модифицированным аналогом DFHBI, DFHBI-1T [11]. Была продемонстрирована возможность применения производных Broccoli для детекции некодирующих РНК в различных организмах [12, 13].

В серии ранее опубликованных работ было выяснено, что использование различных вариантов аптамера Broccoli может приводить к разной интенсивности флуоресценции и изменять правильный фолдинг исследуемой РНК [11–13]. С целью подбора оптимальных по размеру и яркости конструкций в данной работе использовались различные по длине аптамеры. Были сконструированы модульные РНК MTS1338 с Broccoli, 2xdBroccoli, F30-Broccoli, F30-2xdBroccoli, обладающие разными размерами и яркостью флуоресценции. С помощью сервера RNAfold

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности генетических конструкций и олигонуклеотиды, использованные для их получения

Название	Последовательность
rrnB-промотор	CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGACTCCC AGTTTCCAAGGACGTAACCTA
MTS1338	ACCGGGGAAACCCGGTGATCTGCCGAAGTGCTGGGCGATTGAGCGGGTATGTACACCC GGTTTGACCTACCGTCCCAAGACGGGGCTACCGCCTTCGGGCAGATCCTCATCCTGTT
term-терминатор	GCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT
Broccoli	GAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTC
2xdBroccoli	GAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGA GTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTC
F30-Broccoli	TTGCCATGTGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGT GTGGGCTCCACATACTCTGATGATCCTTCGGGATCATTTCATGGCAA
F30-2xdBroccoli	TTGCCATGTGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTC GTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCCACATACT CTGATGATCCAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGT CGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTGGATCATTTCATGGCAA
rrnB-MTS- 1338-F30-2xd- Broccoli-term	CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGACTCCCA GTTTCCAAGGACGTAACCTAACCAGGGGAAACCCGGTGATCTGCCGAAGTGCTGGGCG ATTGAGCGGGTATGTACACCCGTTTGACCTACCGTCCCAAGACGGGGCTACCGCCTTC GGGCAGATCCTCATCCTGTTTTGCCATGTGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAG ACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAG AGTGTGGGCTCCACATACTCTGATGATCCAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTTCG GGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAGAGTGTGG GCTGGATCATTTCATGGCAAGCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT
rrnB-F30-2xd- Broccoli-term	CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGACTCCC AGTTTCCAAGGACGTAACCTATTGCCATGTGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTG AGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAG TAGAGTGTGGGCTCCACATACTCTGATGATCCAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGG TCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTTCGAGTAGAGT GTGGGCTGGATCATTTCATGGCAAGCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT
	Олигонуклеотиды, 5'-3'
Broc_F	GAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTG
Broc_R	GAGCCCACACTCTACTCGACAGATACGAAT
2xdBroc_F	GAGACGGTCGGGTCCATCTG
2xdBroc_R	GAGCCCACACTCTACTCGACATC
Prom1338_F	CTAGAGTGACCGCGTCTGA
Term1338_R	AGCTAAAAAAAAAAACCCCGCTT
T7Pr1338	GTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGACCGGGGAAACCCG
T7PrBroc	GTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGAGACGGTCGGGTC
T7PrF30Broc	GTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGTTGCCATGTGTATG
pMV261_F	GATCTACGTGGCGAACTCCG
pMV261_R	ATGCCTGGCAGTTCGATCGTA

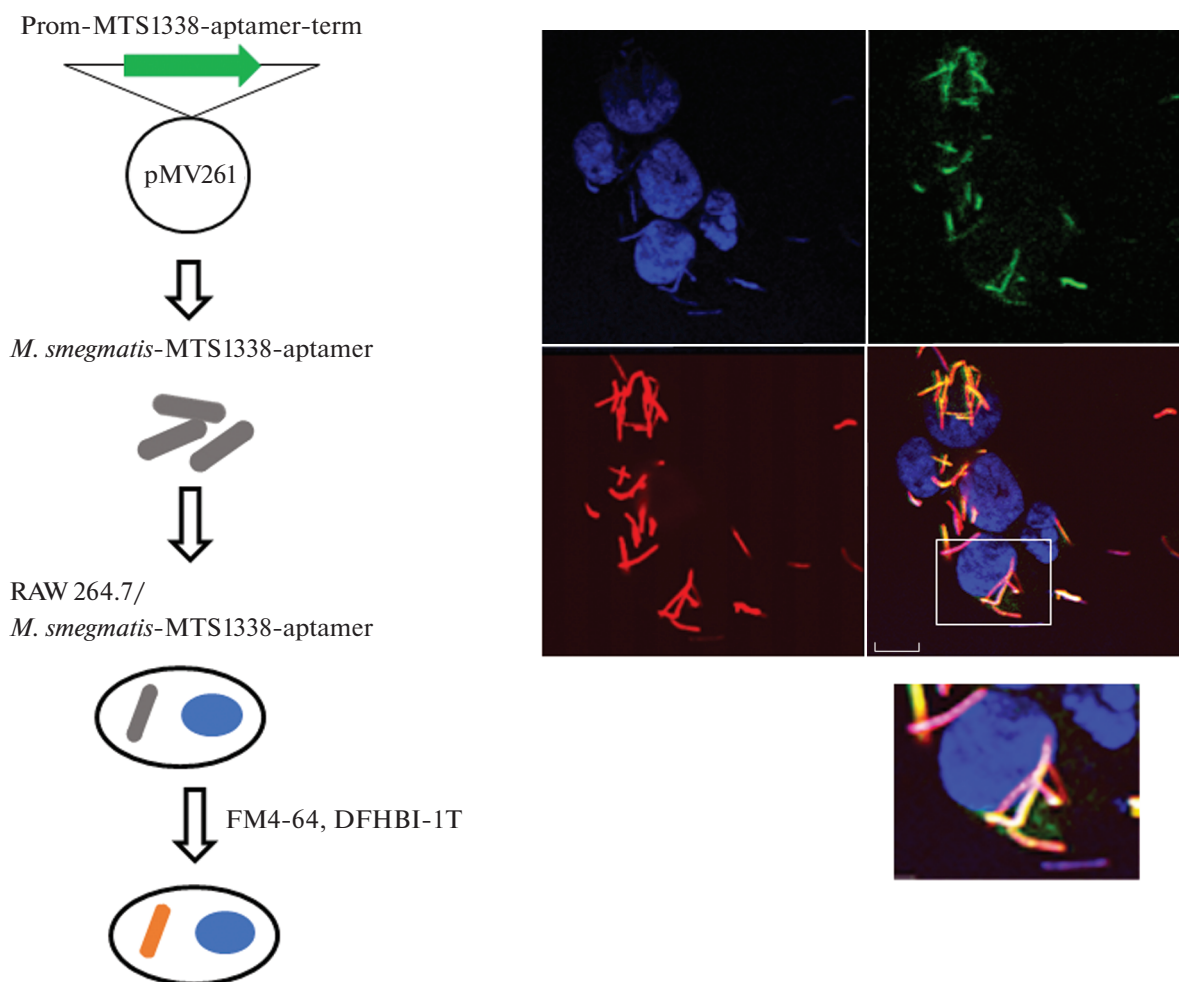


Рис. 2. Визуализация генетически кодируемой модульной РНК MTS1338-F30-2xdBroccoli внутри макрофагов RAW 264.7, инфицированных *M. smegmatis*. Схема эксперимента приведена слева; prom, term – промотор и терминатор соответственно. Конфокальная микроскопия (справа). Клеточные ядра окрашивали Hoechst 33258 (9 мкМ) в течение 15 мин во время инфекции. Детекцию бактерий (красный) и бактериальных модульных РНК (зеленый) осуществляли путем добавления красного красителя мембран FM4-64 (8 мкМ) в инкубационную среду бактерий за 30 мин до инфицирования макрофагов и флуорофора DFHBI-1T (40 мкМ, согласно [12]) при визуализации.

(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) для всех сконструированных РНК была показана высокая вероятность образования правильной вторичной структуры, содержащей два функциональных домена – MTS1338 и аптамер (рис. 1А). Структура модульных РНК и используемые для их получения олигонуклеотидные праймеры приведены в табл. 1.

Для того, чтобы убедиться в возможности укладки модульной РНК в правильную вторичную структуру, при которой РНК может флуоресцировать при взаимодействии с DFHBI-1T, сконструированные модульные РНК синтезировали *in vitro* с использованием набора T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega), разделяли в полиакриламидном геле, инкубировали в растворе флуорофора DFHBI-1T и

анализировали с помощью флуоресцентного визуализатора ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) с использованием зеленого канала прибора (рис. 1Б). Максимальная флуоресценция наблюдалась для РНК MTS1338-F30-2xdBroccoli, поэтому дальнейшие эксперименты проводили с этим аптамером.

В составе шаттл-вектора pMV261, способного реплицироваться как в *E. coli*, так и в микобактериях [14], генетическая конструкция MTS1338-F30-2xdBroccoli была трансформирована в *Mycobacterium smegmatis* MC² 155. Эти непатогенные бактерии используются в качестве суррогатного организма при изучении *M. tuberculosis*, поскольку их геномы, а также метаболизм очень сходны, при этом *M. smegmatis* обладает значительно большей скоростью роста и гораздо легче подвергается

ся генетической модификации [15]. *M. smegmatis* не содержит гена исследуемой малой РНК.

Для визуализации модульных РНК в бактериях внутри макрофагов проводили инфицирование клеточной культуры макрофагов мыши RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) штаммом *M. smegmatis* MTS1338-F30-2xdBroccoli. Макрофаги, выращенные на покровных стеклах в среде RPMI-1640, 10% FCS при 5% CO₂, 37°C до конfluence 70%, инфицировали с МОИ 10:1 (множественность инфекции – количество бактерий на один макрофаг). Инфицирование проводили в течение 1 ч. После инфекции среду удаляли, промывали макрофаги PBS и анализировали препараты на конфокальном микроскопе Eclipse TE2000 (Nikon, Япония) (рис. 2). На полученных изображениях наблюдалась колокализация зеленых (флуоресцирующие модульные РНК) и красных (бактерии) сигналов, что свидетельствует о том, что модульная РНК, содержащая MTS1338, синтезируется, складывается в корректную вторичную структуру и взаимодействует с флуорофором в микобактериях, поглощенных макрофагами. Также были отмечены зеленые сигналы в цитоплазме макрофагов, окружающие бактерии. Возможно, эти сигналы указывают на секрецию в цитоплазму макрофагов MTS1338 в составе модульной РНК, что будет проверено нами в дальнейшем.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали возможность детекции методом флуоресцентной микроскопии малых бактериальных РНК при персистенции бактерий внутри макрофагов. Данная система в дальнейшем будет использована в исследованиях по выявлению роли малых РНК *M. tuberculosis* в патогенезе туберкулеза, процессов секреции этих РНК в инфицированных макрофагах, поиска их эукариотических мишеней, а также молекулярных путей, на которые могут оказывать воздействие эти малые РНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.С. Баранову за любезно предоставленный DFHVI-1Г и Н.Г. Гурской за предоставление плазмид, содержащих Broccoli-аптамеры.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00332).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Azhikina T.L., Ignatov D.V., Salina E.G. et al* Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80. № 13. P. 1633–1646.

2. *Holmqvist E., Wagner E.G.H.* Impact of bacterial sRNAs in stress responses // *Biochem Soc Trans*. 2017. V. 45. № 6. P. 1203–1212.

3. *Ignatov D.V., Timoshina O., Logunova N.N. et al.* Expression of Mycobacterium tuberculosis small RNAs in mice models of tuberculosis // *Bioorg Khim*. 2014. V. 40. № 2. P. 253–256.

4. *Salina E.G., Grigorov A., Skvortsova Y. et al.* 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. V. 9. P. 405.

5. *Gu H., Zhao C., Zhang T. et al.* Salmonella produce microRNA-like RNA fragment Sal-1 in the infected cells to facilitate intracellular survival // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 2392.

6. *Pagliuso A., Tham T.N., Allemand E. et al.* An RNA-Binding Protein Secreted by a Bacterial Pathogen Modulates RIG-I Signaling // *Cell Host Microbe*. 2019. V. 26. № 6. P. 823–835.

7. *Tyagi S.* Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. № 5. P. 331–338.

8. *Bertrand E., Chartrand P., Schaefer M. et al.* Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast // *Mol. Cell*. 1998. V. 2. № 4. P. 437–445.

9. *Babendure J.R., Adams S.R., Tsien R.Y.* Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes // *J. Am. Chem. Soc*. 2003. V. 125. № 48. P. 14716–14717.

10. *Paige J.S., Wu K., Jaffrey S.R.* RNA mimics of green fluorescent protein // *Science*. 2011. V. 333. № 6042. P. 642–646.

11. *Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N. et al.* Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution // *J. Am. Chem. Soc*. 2014. V. 136. № 46. P. 16299–16308.

12. *Filonov G.S., Jaffrey S.R.* RNA Imaging with Dimeric Broccoli in Live Bacterial and Mammalian Cells // *Curr. Protoc. Chem. Biol*. 2016. V. 8. № 1. P. 1–28.

13. *Zinskie J.A., Roig M., Janetopoulos C. et al.* Live-cell imaging of small nucleolar RNA tagged with the broccoli aptamer in yeast // *FEMS Yeast Res*. 2018. V. 53. № 6. P. 333–337.

14. *Stover C.K., de la Cruz V.F., Fuerst T.R. et al.* New use of BCG for recombinant vaccines // *Nature*. 1991. V. 351. № 6326. P. 456–460.

15. *Chaturvedi V., Dwivedi N., Tripathi R.P. et al.* Evaluation of Mycobacterium smegmatis as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis // *J. Gen. Appl. Microbiol*. 2007. V. 53. № 6. P. 333–337.

USE OF GENETICALLY ENCODED FLUORESCENT APTAMERS FOR VISUALIZATION OF SMALL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* RNA MTS1338 IN INFECTED MACROPHAGES

O. S. Bychenko^{a,#}, Y. V. Skvortsova^a, A. S. Grigorov^a, and T. L. Azhikina^a

^a Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#] e-mail: bychenko.oksana@gmail.com

Presented by Academician of the RAS S. A. Luk'yanov

A possibility to visualize small bacterial RNAs inside macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* have been demonstrated for the first time. A macrophage cell line was infected with the *M. tuberculosis* strain expressing small non-coding mycobacterial RNA MTS1338 fused with an RNA-aptamer, which could bind a fluorophore and trigger its fluorescence. As a result, treatment of the infected macrophages with the DFHBI-1T fluorophore allowed fluorescence-based detection of the aptamer-labeled MTS1338 both in mycobacteria and in the host cell cytoplasm. This system could significantly aid in revealing the role of small *M. tuberculosis* RNAs in the pathogenesis of tuberculosis through identification of their secretion routes and eukaryotic targets and elucidation of the associated molecular pathways.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, small non-coding RNA, MTS1338, Broccoli-aptamer, infection