

УДК 577.29

МАЛЫЕ РНК *Mycobacterium tuberculosis* В АДАПТАЦИИ К СТРЕССОВЫМ УСЛОВИЯМ, МОДЕЛИРУЮЩИМ ИНФЕКЦИЮ *in vitro*

© 2020 г. А. А. Острик^{1, *}, Е. Г. Салина¹, Ю. В. Скворцова², А. С. Григоров²,
О. С. Быченко², А. С. Капрельянц¹, Т. Л. Ажикина²

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

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

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

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Ранее была выявлена роль малых некодирующих РНК в регуляции метаболизма *Mycobacterium tuberculosis*. В работе показано, что выживаемость *M. tuberculosis* в условиях, имитирующих попадание бактерии в организм человека при инфекции, зависела от уровня экспрессии малых РНК. Получены штаммы *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующие малые РНК MTS1338 и MTS0997, изучена их выживаемость в стрессовых условиях *in vitro* и в макрофагах человека. Гиперэкспрессия малой некодирующей РНК MTS1338 повышала устойчивость бактерий к стрессовому воздействию пероксида водорода, оксида азота, кислой среды и длительного ограничения питательных веществ на разных стадиях роста культуры и способствовала сохранению жизнеспособности бактерий в макрофагах. Гиперэкспрессия малой некодирующей РНК MTS0997 не оказывала существенного влияния на способность клеток переживать стрессовые условия.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, малые некодирующие РНК, инфекция макрофагов

DOI: 10.31857/S0555109920040121

Малые РНК выполняют роль транскрипционных регуляторов у бактерий, позволяя клеткам быстро реагировать на изменяющиеся условия среды [1, 2]. Многие малые РНК обнаружены у патогенных видов бактерий, и показана их роль в развитии заболеваний [3]. Туберкулез является чрезвычайно распространенной инфекцией и занимает 9 место среди причин смертности населения в мире [4]. В России в 2018 г. диагностировано более 60 тысяч новых случаев активной формы туберкулеза [https://gospotrebnadzor.ru]. Возбудитель инфекции *Mycobacterium tuberculosis* может длительно сохраняться в организме, обуславливая латентную инфекцию, которая способна переходить в активную форму под влиянием снижения иммунного статуса [5]. Механизмы, позволяющие микобактериям избегать факторов иммунной защиты организма хозяина, длительно сохранять жизнеспособность в условиях стрессового воздействия при внутриклеточном персистировании и переходить из покоящегося состояния в активное, обуславливают успешность *M. tuberculosis* как возбудителя инфекции и являются предметом тщательного изучения. Считается, что малые РНК играют важную роль в приспособлении ми-

кобактерий к паразитическому образу жизни [6]. В настоящее время у *M. tuberculosis* с помощью биоинформационного анализа транскриптомных профилей предсказано несколько сотен малых РНК, часть из которых подтверждена экспериментально [3, 7]. Механизм регуляторного действия, однако, установлен лишь для нескольких из них.

Впервые функция малой РНК в *M. tuberculosis* была установлена для малой РНК *mcr7* [8]. Она является одним из транскрипционных регуляторов в двухкомпонентной системе PhoPR, которая играет важную роль в проявлении вирулентных свойств микобактерий. *Mcr7* изменяет трансляцию мРНК гена *tatC*, тем самым влияя на активность белка Tat (Twin Arginine Translocation protein), в результате чего нарушается секреция иммунодоминантного комплекса Ag85 и бета-лактамазы BlaC. В условиях дефицита железа и, в меньшей степени, при повреждении мембран и при окислительном стрессе, в клетке возрастает концентрация малой РНК *MrsI* (ncRv11846, *mycobacterial regulatory sRNA in iron*) [9]. Посредством прямого связывания с мРНК она регулирует экспрессию железо-связывающих белков, подготавливая бакте-

рию к существованию внутри клетки хозяина. 6С — еще одна малая РНК, для которой недавно доказан механизм действия, имеет сайт связывания с мРНК гена *panD*, кодирующего аспаратдекарбоксилазу, и с мРНК гена *dnaB*, кодирующего репликативную ДНК-хеликазу [10]. В результате взаимодействия репрессируется трансляция кодируемых белков, что приводит к замедлению роста бактерий.

Особое внимание привлекают малые РНК, индуцируемые во время инфекции. Изучение их функции может приблизить нас к пониманию механизмов патогенеза туберкулеза. К таким малым РНК относятся MTS0997 (MTB000063, *mcr11*) и MTS1338 (MTB000077, *DrrS*), которые и стали предметом исследования в работе [1, 11]. Эти малые РНК присутствуют только у патогенных видов микобактерий (*M. tuberculosis* complex), имеют стабильную вторичную структуру и высоко консервативны. Впервые они были обнаружены при анализе тотального транскриптома *M. tuberculosis* методом RNA-seq и подтверждены Нозерн-блоттингом [12].

Изучение этих малых РНК выявило некоторые закономерности их транскрипции, посттранскрипционных модификаций и деградации, но механизм их действия и роль в патогенезе инфекции до сих пор не известны. MTS0997 и MTS1338 накапливаются в клетках в стационарной фазе роста, а в моделях инфекции мышей, восприимчивых к туберкулезу, уровни транскрипции данных малых РНК возрастают многократно и сравнимы с уровнем 16S рРНК [12]. Это позволяет предположить, что они регулируют ответ на стрессовое воздействие, которое микобактерии испытывают после фагоцитоза в организме хозяина.

Экспрессия малой РНК MTS0997 зависит от фазы роста микобактерий, а также от условий: уровень повышается при голодании и снижается при выращивании в кислой среде [13]. РНК MTS0997 функционально связана со смежными генами — *Rv1264* и *Rv1265*. *Rv1265* кодирует ДНК-, АТФ-связывающий белок (*AbmR*), увеличивающий экспрессию *Mcr11* в стационарной фазе роста [14]. Предполагаемые мишени MTS0997 — мРНК генов *Rv3282*, *fadA3* и *lipB*, вовлеченных в липидный метаболизм [15]. При выращивании *M. tuberculosis* и *M. bovis* в среде без источников жирных кислот штаммы с делецией малой РНК MTS0997 отставали в росте. РНК MTS1338 является очень стабильным транскриптом, время полужизни которого составляет 6 ч [16], ее экспрессия функционально связана с регулоном *DosR*, активирующемся при стрессовом воздействии оксида азота, свободных радикалов кислорода и гипоксии. Было показано, что малые РНК MTS0997 и MTS1338 высокоэкспрессированы в покоящихся “некультивируемых” клетках *M. tuberculosis in vitro*, гиперэкспрессия этих ма-

лых РНК в клетках приводит к замедлению их роста в стандартных условиях *in vitro* [17].

Полученные данные указывают на возможную роль малых РНК MTS0997 и MTS1338 во взаимодействии “патоген-хозяин”, в первую очередь при адаптации микроорганизмов к персистенции внутри макроорганизма. Попадая в организм человека, микобактерии фагоцитируются макрофагами, где они способны сохранять жизнеспособность на протяжении длительного времени, несмотря на агрессивную внутриклеточную среду: продукцию NO, окислительный стресс, низкие значения pH (до 5.5), а также недостаток питательных веществ.

Цель работы — изучение влияния гиперэкспрессии малых РНК MTS1338 и MTS0997 на выживаемость *M. tuberculosis* в условиях стресса.

МЕТОДИКА

Культивирование бактерий. Бактерии *M. tuberculosis* штамм H37Rv (“ЦНИИ Туберкулеза”, Россия) выращивали в жидкой среде Сотона (г/л дистиллированной воды: L-аспарагин — 4, K_2HPO_4 — 0.5, MgSO_4 — 1.4, железо лимоннокислое аммиачное — 0.05, натрий лимоннокислый трехзамещенный — 2, ZnSO_4 — 0.1, глицерин — 60 мл, pH 7.2) в присутствии ростовой добавки альбумин-декстроза-каталаза (АДК, “HiMedia”, Индия), 0.05% твина-80 при 37°C. Культивирование проводили при перемешивании (200 об./мин) в течение 7 сут до достижения логарифмической фазы роста (оптическая плотность $\text{OP}_{600} = 1-1.5$) или в течение 15–16 сут до достижения стационарной фазы роста ($\text{OP}_{600} > 10$). Для штаммов, содержащих плазмиду, в среду вносили канамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Исходная концентрация бактерий определялась посевом культуры на чашки с плотной питательной средой Миддлбрука 7H11 с ростовой добавкой АДК.

Гиперэкспрессия малых РНК. Штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформировали посредством электропорации плазмидой pMV-261, содержащей вставку с геном малой РНК MTS0997 (0997over) или малой РНК MTS1338 (1338 over), под микобактериальным промотором *gntV*. Плазмиды были получены как описано ранее [17]. Гиперэкспрессия была подтверждена методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Для выделения РНК клетки бактерий быстро охлаждали на льду, центрифугировали, тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, как описано ранее [18]. Клетки разрушали с помощью кремний-циркониевых бус на дезинтеграторе BeadBeater (“BioSpec Products”, США). После выделения РНК образцы обрабатывали ДНКазой I Turbo DNase (“Life Technologies”, США) для удаления примеси геномной ДНК. Для син-

теза комплементарной ДНК (кДНК) использовали 1 мкг тотальной РНК, гексануклеотидные праймеры Random(dN)₆ и обратную транскриптазу SuperScript III (“Life Technologies”, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Количественную ПЦР проводили с использованием смеси реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Evrogen” Россия) и амплификатора LightCycler 480 (“Roche”, Швейцария). Условия амплификации: 20 с при 95°C, 20 с при 61°C, 30 с при 72°C, 40 циклов. Все опыты были сделаны в трех повторностях. Данные ПЦР в реальном времени обсчитывали с помощью программ LightCycler480, LC480 Conversion, LinReg-PCR и Microsoft Excel. Уровень экспрессии генов малых РНК нормировали по референсному гену 16S рРНК.

Праймеры для ОТ-ПЦР:

qPCR_MTS1338_for GGGGAAACCCGGT-GATCTG; qPCR_MTS1338_rev GGTAGGTCAAACCCGGGTGTACAT; qPCR_MTS0997_for GAAGCAGGCCCGGTTAGTGA; qPCR_MTS0997_rev GGCAGACCCGGCGTGACT; 16S_MTB_for TACGTAGGGTGCAGCGTTG; 16S_MTB_rev CCCGCACGCTCACAGTTAAG.

Стрессовое воздействие. Воздействие стресса изучали, используя штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформированный плазмидой pMV-261, содержащей вставку с геном малой РНК MTS0997 (0997over) или малой РНК MTS1338 (1338over), в качестве контроля использовали штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформированный плазмидой pMV-261 без вставки. Клетки *M. tuberculosis*, собранные в логарифмической фазе роста (7 сут культивирования), отмывали 10 мМ фосфатно-солевым буферным раствором pH 7.4 (ФСБР) и разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК до оптической плотности (ОП₆₀₀) 0.2, после чего добавляли H₂O₂ в концентрации 5 мМ для создания условий окислительного стресса, донор оксида азота – диэтиленetriамин-NO (ДЕТА-NO) (“Sigma”, США) в конечной концентрации 500 мкМ для создания нитрозативного стресса. Для создания кислотного стресса клетки разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК и pH 5.8 до оптической плотности 0.2 (ОП₆₀₀).

Клетки культуры осаждали при 4000 g и отмывали ФСБР, а затем разводили до оптической плотности 0.2 (ОП₆₀₀) в собственном супернатанте с добавлением стрессовых агентов: H₂O₂ (10 мМ) или ДЕТА-NO (500 мкМ). Для кислотного стресса отмываемые культуры разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК и 0.05% твина-80, с pH 5.8. Бактерии инкубировали со стрессовыми агентами в течение 48 ч при 37°C и перемешивании (200 об./мин). Для создания условий ограничения питательных веществ бактерии помещали в ФСБР на 28 сут при 37°C в статическом режиме.

Стрессовое воздействие оценивали по изменению уровня метаболической активности клеток, которую, в свою очередь, оценивали по уровню включения радиоактивно меченого урацила. Для этого 2 мкл 5,6-³H-урацила (2 мкКи) добавляли к 1 мл культуры и инкубировали 20 ч при 37°C и перемешивании. Затем 200 мкл культуры помещали в 7%-ный раствор уксусной кислоты на 15 мин при 0°C, после чего осаждали фильтрованием на стекловолоконном микрофилт্রে (“Whatman”, США). Осажденные клетки промывали 3 мл 7%-ной уксусной кислоты и 3 мл 96%-ного этанола. Фильтр помещали в сцинтилляционную жидкость Ultima Gold (“PerkinElmer”, США), подсчет импульсов осуществляли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS analyser (“Beckman Instruments Inc.”, США). Выживаемость бактерий оценивали по изменению КОЕ при посеве на плотную питательную среду в сравнении с контрольным образцом без стрессового воздействия. Каждый опыт был сделан в трех повторностях.

Инфекция макрофагов. Культуру клеток моноцитов человека THP-1 (ATCC #TIB-202). Клеточная линия была предоставлена Копниным П.Б. (НИИ Канцерогенеза “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, лаборатория цитогенетики) высевали в 24-луночные планшеты (“Costar”, США) и дифференцировали в присутствии 100 нг/мл форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА, “Sigma-Aldrich”, США) в течение 48 ч в среде RPMI-1640 (“Gibco BRL”, США), с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (“Gibco BRL”, США) при 5%-ном CO₂, 37°C. Бактерии выращивали до логарифмической фазы роста (ОП₆₀₀ = 0.5–1) в питательной среде Миддлбука 7Н9 с ростовой добавкой АДК, содержащей канамицин (50 мкг/мл) и твин-80 (0.05%). Клетки отделяли центрифугированием при 4000 g и отмывали ФСБР, затем ресуспендировали в среде RPMI-1640 и проводили инфицирование при 37°C в течение 4 ч. Заражение проводили в лунках 24-луночного планшета (500 мкл), используя различную концентрацию бактерий (МОИ 2.0 и 0.5 – множественность инфицирования макрофагов: микобактерии 1 : 2 и 1 : 0.5). После фагоцитирования макрофаги отмывали от непоглощенных микобактерий ФСБР 5 раз, далее через 4, 24, 48, и 72 ч от начала инфекции проводили лизис макрофагов 0.05%-ным раствором ДДС-Na 30 мин при 37°C и высевали микобактерии на плотную среду Миддлбука с АДК для подсчета КОЕ. Бактерии выращивали при 37°C в течение 20–22 сут. Каждый опыт был сделан в трех повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью непарного t теста Стьюдента. За статистически достоверные принимались значения с $p < 0.05$.

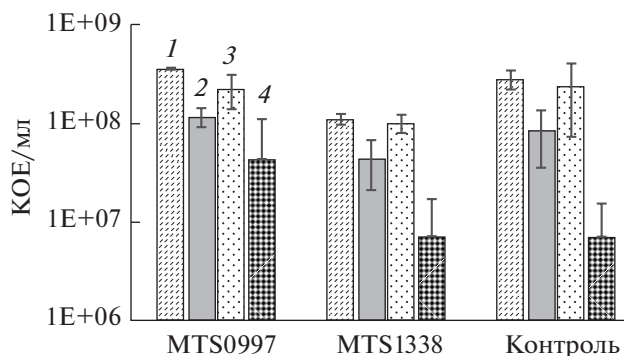


Рис. 1. Выживаемость клеток *M. tuberculosis* логарифмической фазы роста штаммов 099 over, 1338 over и контрольного 48 ч без стрессового воздействия (1), в кислой среде (2), в присутствии H₂O₂ (3) и через 28 сут голодания в фосфатно-солевом буферном растворе (4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В цитоплазме макрофагов в организме хозяина микобактерии подвергаются целому ряду стрессовых воздействий: кислая среда, перекисное окисление, присутствие оксида азота NO и нехватка питательных веществ. Изучено влияние этих стрессовых факторов на клетки *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующие малые РНК MTS0997 и MTS1338, в логарифмической и в стационарной фазе роста *in vitro*. Для экспрессии экзогенных копий малых РНК использовали модифицированный плазмидный вектор pMV261, содержащий ген исследуемой малой РНК под контролем промотора гена *gntB*, который обеспечивает высокий уровень транскрипции [17]. Клетки *M. tuberculosis* трансформировали этим вектором, в качестве контроля использовали плазмиду без вставки (пустой вектор). Для подтверждения гиперэкспрессии малых РНК в полученных штаммах проводили количественную ОТ-ПЦР, которая показала, что количество транскриптов MTS0997 в логарифмической фазе роста культуры увеличивалось в 5–6 раз, MTS1338 – в 8–10.

Стрессовое воздействие на клетки, собранные в логарифмической фазе роста, оценивали путем посева на плотную питательную среду и подсчета КОЕ, сравнивая с величинами КОЕ контрольного образца клеток, не подвергнувшегося стрессовому воздействию (рис. 1), а также по изменению метаболической активности клеток, регистрируемой по уровню включения радиоактивно меченного ³H-урацила (рис. 2). Для штаммов, не подвергнувшихся стрессовым воздействиям, уровень включения урацила был принят за 100%.

Сравнение величин КОЕ обнаружило, что низкие значения pH среды и длительное голодание в ФСБР негативно влияли на выживаемость бактерий. При сравнении КОЕ клеток, подвергнувшихся стрессовому воздействию, с контрольным образ-

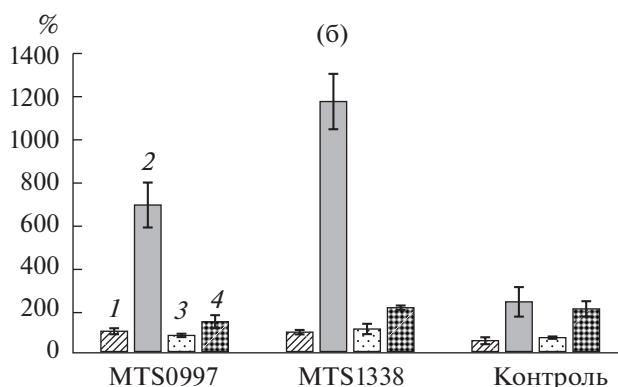
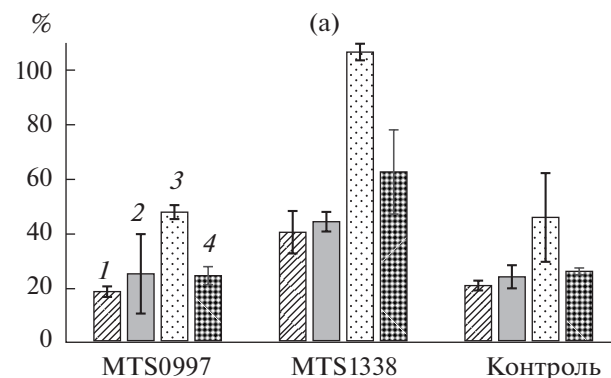


Рис. 2. Уровни включения ³H-урацила в клетки *M. tuberculosis* 0997 over, 1338 over и контрольного штамма (в % к штамму без воздействия) через 48 ч после воздействия NO (1), кислой среды (2), H₂O₂ (3) и через 28 сут голодания в фосфатно-солевом буферном растворе (4) для клеток в логарифмической (а) и стационарной (б) фазы роста.

цом, можно заметить, что относительное снижение выживаемости было минимальным у штамма с гиперэкспрессией MTS1338 (рис. 1). Следует отметить, что пероксид водорода не оказывал существенного действия на выживаемость клеток контрольного штамма и штаммов с гиперэкспрессией MTS0997 и MTS1338, однако изменял уровень включения радиоактивно меченного ³H-урацила (рис. 2а).

Все три штамма демонстрировали снижение уровня включения ³H-урацила в присутствии H₂O₂, однако штамм с гиперэкспрессией MTS1338 был наименее подвержен окислительному стрессу – уровень включения ³H-урацила был сравним с таковым в отсутствии стресса. Наиболее выраженное воздействие на все исследуемые штаммы *M. tuberculosis* оказывал оксид азота(II). Штамм с гиперэкспрессией малой РНК MTS1338 был более устойчив к NO, чем контрольный штамм, статистически достоверных различий между штаммом, гиперэкспрессирующим MTS0997, и контрольным штаммом не было выявлено. При инкубировании

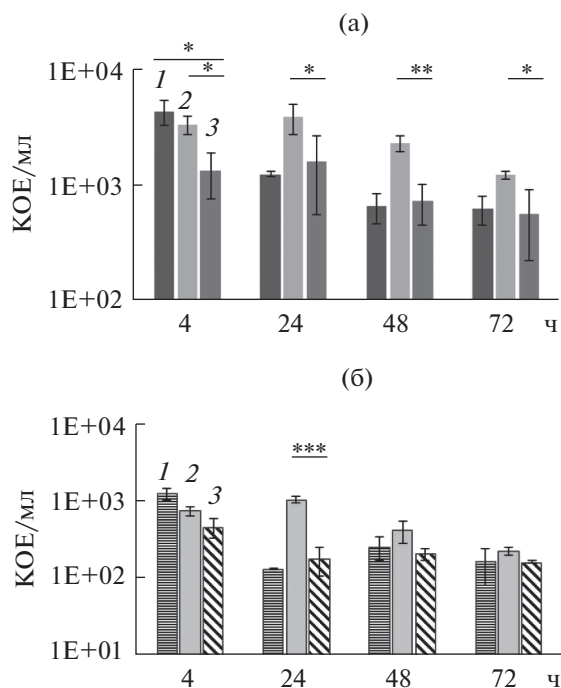


Рис. 3. Выживаемость *M. tuberculosis* штаммов 0997over (1), 1338over (2) и контрольного штамма (3) внутри макрофагов при MOI = 2 (а) и MOI = 0.5 (б); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

бактерий в кислой среде выживаемость *M. tuberculosis* падала, что подтверждалось снижением уровня включения урацила. В условиях длительного голодания штамм с гиперэкспрессией малой РНК MTS1338 также демонстрировал значительную устойчивость.

При оценке изменения метаболической активности клеток стационарной фазы роста было обнаружено, что все исследуемые штаммы микобактерий были более устойчивы к воздействию стрессовых факторов по сравнению с клетками в логарифмической фазе роста (рис. 2б). Следует отметить, что культивирование в среде с низким значением pH приводило к значительной активации клеток и их делению. Вероятно, это связано с выделением микобактериями ионов аммония в результате работы таких ферментов, как аспарагиназа (Rv1538с), моноаминоксидаза (Rv3170) или деаминаза (Rv0828с) [19], что приводило к защелачиванию среды и формированию благоприятных для роста условий. При этом метаболическая активность штаммов с гиперэкспрессией малых РНК спустя 48 ч была значительно выше исходных значений (до воздействия стресса), что более выражено для гиперэкспрессии MTS1338.

Ранее было показано, что экспрессия малой РНК MTS0997 снижается в кислой среде и при воздействии оксида азота, и повышается при голодании [13], при этом накопление малой РНК не

изменялось в условиях гипоксии [20]. Таким образом, дифференциальная экспрессия малой РНК MTS0997 в условиях стресса указывала на возможное ее участие в процессах адаптации. Показано, что индуцированное увеличение синтеза РНК MTS0997 в клетке существенно не отражалось на ее выживаемости в этих условиях. Напротив, гиперэкспрессия MTS1338 приводила к повышению устойчивости бактерии к стрессу, что подтвердили данные о ее роли в патогенезе *M. tuberculosis* [12, 21].

При экспериментальном заражении мышей *M. tuberculosis* в бактериальном транскриптоме накапливаются малые РНК MTS1338 и MTS0997 в высоких концентрациях, сравнимых с рибосомными РНК [12, 21]. Кроме того, экспрессия MTS1338 повышается в макрофагах, активированных γ -интерфероном [11].

Чтобы оценить вклад малых РНК в способность микобактерий приспосабливаться к внутриклеточному существованию, проводили инфекцию макрофагов человека штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, гиперэкспрессирующими малые РНК MTS1338 и MTS0997. Культуру клеток THP-1, дифференцированную в макрофаги, инфицировали бактериями с MOI 2.0 и 0.5 и определяли выживаемость бактерий в разное время по высеву на твердую среду. Гиперэкспрессия MTS1338 положительно влияла на выживаемость микобактерий внутри макрофагов во всех временных точках, наиболее ярко эффект проявился при MOI 2.0. Для штамма, гиперэкспрессирующего MTS0997, не было выявлено достоверной разницы выживаемости бактерий при инфекции.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что существует связь малой РНК MTS1338 с адаптацией микобактерии к персистенции внутри макрофагов во время инфекции *M. tuberculosis*. Механизм действия данной малой РНК может быть выяснен с помощью дальнейшего изучения профилей транскрипции *M. tuberculosis* под действием стрессовых факторов, аналогичным тем, которые бактерии испытывают в среде макроорганизма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00332).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ажикина Т.Л., Игнатов Д.В., Салина Е.Г., Фурсов М.В., Капсельяни А. С. // Успехи биологической химии. 2015. Т. 55. С. 3–32.
2. Gottesman S., Storz G. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2011. V. 71. P. 1–16.
3. Haning K., Cho S.H., Contreras L.M., Murphy E.R. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 1–11.
4. World Health Organization. Geneva: Global Tuberculosis Report, 2019. 283 p. ISBN 978-92-4-156571-4.

5. Dye C. // Lancet. 2006. V. 367. № 9514. P. 938–940.
6. Schwenk S., Arnvig K.B. // Pathog. Dis. 2018. V. 76. № 4. P. 1–12.
7. Namouchi A., Gómez-Muñoz M., Frye S.A., Moen L.V., Rognes T., Tønjum T., Balasingham S.V. // BMC Genomics. 2016. V. 17. № 1. P. 1–13.
8. Solans L., Gonzalo-Asensio J., Sala C., Benjak A., Uplekar S., Rougemont J., Guilhot C., Malaga W., Marti'n C., Cole S.T. // PLoS Pathog. 2014. V. 10. № 5. P. 1–17.
9. Gerrick E.R., Barbier T., Chase M.R., Xu R., François J., Lin V.H., Szucs M.J., Rock J.M., Ahmad R., Tjaden B., Livny J., Fortune S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2018. V. 115. № 25. P. 6464–6469.
10. Mai J., Rao C., Watt J., Sun X., Lin Z., Zhang L., Liu J. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. № 8. P. 4292–4307.
11. Salina E.G., Grigorov A., Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., Ostrik A., Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. № 405. P. 1–11.
12. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T., Parkhill J., Dougan G., Young D.B. // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 11. P. 1–16.
13. Pelly S., Bishai W.R., Lamichhane G. // Gene. 2012. V. 500. № 1. P. 85–92.
14. Girardin R.C., Bai G., He J., Sui H., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2018. V. 110. № 5. P. 811–830.
15. Girardin R.C., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2019. V. 111. № 5. P. 1–17.
16. Moores A., Riesco A.B., Schwenk S., Arnvig K.B. // PLoS One. 2017 V. 12. № 3. P. 1–27.
17. 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.
18. Rustad T.R., Roberts D.M., Liao R.P., Sherman D.R. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 465. P. 13–21.
19. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis. 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
20. 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.
21. Игнатов Д.В., Логунова Н.Н., Ажикина Т.Л. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. № 2. С. 253–256.

Small RNAs of *Mycobacterium tuberculosis* in Adaptation to Host-Like Stress Conditions *in vitro*

A. A. Ostrik^{a,*}, E. G. Salina^a, Y. V. Skvortsova^b, A. S. Grigorov^b,
O. S. Bychenko^b, A. S. Kaprelyants^a, and T. L. Azhikina^b

^aBach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

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

Regulatory mechanisms of pathogenic bacteria contribute to their survival under stress conditions in the host environment, which allows them to avoid the immune system of the macroorganism. Previously small non-coding RNAs were found to regulate some metabolic processes of *Mycobacterium tuberculosis*. Here we revealed that viability of *M. tuberculosis* in host-like conditions depends on the small RNAs expression level. Strains overexpressing small RNAs MTS1338 and MTS0997 in *M. tuberculosis* were produced and their survival under stressful conditions *in vitro* and in infected human macrophages were studied. We found that overexpression of the small non-coding RNA MTS1338 increased bacterial resistance to stressful effects of hydrogen peroxide, nitric oxide, acidic environment and long-term lack of nutrients at different growth phases, and contributed viability of bacteria in infected macrophages. Overexpression of small non-coding RNA MTS0997 did not significantly affect cell viability under stress conditions. Thus, the two small RNAs studied play different roles in the adaptation of mycobacteria to intracellular stresses during infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, small non-coding RNAs, macrophage infection