

ВЛИЯНИЕ СУБИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ G4-СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ЛИГАНДОВ НА ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

М. В. Зайчикова, Д. А. Беспятых, М. В. Малахова, И. Н. Бодоев, Т. С. Ведехина, В. А. Веселовский, К. М. Климина, А. М. Варижук, Е. А. Шитиков 

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

В связи с широким распространением лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* особое значение приобретает поиск противотуберкулезных препаратов с принципиально новым механизмом действия, исключающим развитие перекрестной устойчивости. В этом отношении определенный интерес представляют G-квадруплексы (G4) — неканонические структуры ДНК, участвующие в регуляции и поддержании стабильности генома. Показано, что G4-стабилизирующие соединения, лиганды, оказывают ингибирующий эффект на рост микроорганизма, но точный механизм их действия неизвестен. Целью исследования было выявить связь между наличием потенциальных G4 в геноме модельного микроорганизма *M. smegmatis* mc2 155 и изменением транскриптомного профиля под действием субингибирующих концентраций лигандов BRACO-19 и TMPyP4, а также провести сравнительный анализ результатов с данными, полученными нами ранее для ингибирующих концентраций указанных лигандов. Под действием BRACO-19 было идентифицировано 589 (316↑; 273↓) и 865 (555↑; 310↓) дифференциально экспрессированных генов, для 5 и 10 мкМ соответственно. Напротив, в случае с TMPyP4 обнаружено снижение числа дифференциально экспрессированных генов с 754 (337↑; 417↓) до 702 (359↑; 343↓) для концентраций 2 и 4 мкМ соответственно. Статистический анализ не выявил связи между изменением уровня экспрессии генов под действием лигандов и наличием потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей, вне зависимости от локализации G4. Тем не менее было установлено, что TMPyP4 вызывает значительные изменения в экспрессии факторов транскрипции и генах биосинтеза аргинина, а BRACO-19 — в генах метаболизма железа, а также в генах систем репликации и репарации.

Ключевые слова: G-квадруплексы, транскриптомный анализ, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, BRACO-19, TMPyP4, антимикробная терапия

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-75-10109).

Вклад авторов: М. В. Зайчикова — анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Д. А. Беспятых — анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи; М. В. Малахова — планирование и проведение исследования; И. Н. Бодоев — анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи; Т. С. Ведехина — проведение исследования, интерпретация данных; В. А. Веселовский — проведение исследования, анализ данных; К. М. Климина — проведение исследования, анализ и интерпретация данных; А. М. Варижук — планирование и проведение исследования, интерпретация данных; Е. А. Шитиков — планирование исследования, анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Егор Александрович Шитиков
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; eshitikov@mail.ru

Статья получена: 08.04.2022 **Статья принята к печати:** 30.04.2022 **Опубликована онлайн:** 15.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.024

TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* EXPOSED TO SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS OF G4-STABILIZING LIGANDS

Zaychikova MV, Bespiatykh DA, Malakhova MV, Bodoev IN, Vedekhina TS, Veselovsky VA, Klimina KM, Varizhuk AM, Shitikov EA 

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

The spread of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance accentuates the demand for anti-tuberculosis drugs with a fundamentally new mechanism of action without conferring cross-resistance. G-quadruplexes (G4, non-canonical DNA structures) are plausible new drug targets. Although G4-stabilizing ligands have been shown to inhibit mycobacterial growth, the exact mechanism of their action is uncertain. The aim of this study was to assess a possible correlation between putative G4 elements in a model mycobacterial strain *M. smegmatis* MC2155 and transcriptomic changes under the action of subinhibitory concentrations of G4 ligands BRACO-19 and TMPyP4. We also planned to compare the results with corresponding data previously obtained by us using higher, inhibitory concentrations of these ligands. For BRACO-19, we identified 589 (316↑; 273↓) and 865 (555↑; 310↓) differentially expressed genes at 5 μM and 10 μM, respectively. For TMPyP4, we observed the opposite trend, the number of differentially expressed genes decreased at higher concentration of the ligand: 754 (337↑; 417↓) and 702 (359↑; 343↓) for 2 μM and 4 μM, respectively. Statistical analysis revealed no correlation between ligand-induced transcriptomic changes and genomic localization of the putative quadruplex-forming sequences. At the same time, the data indicate certain functional specificity of the ligand-mediated transcriptomic effects, with TMPyP4 significantly affecting expression levels of transcription factors and arginine biosynthesis genes and BRACO-19 significantly affecting expression levels of iron metabolism and replication and reparation system genes.

Keywords: G-quadruplexes, transcriptomic analysis, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, BRACO-19, TMPyP4, antimicrobial therapy

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project number 19-75-10109

Author contribution: Zaychikova MV — literature analysis, data analysis and interpretation, manuscript drafting; Bespiatykh DA — literature analysis, data analysis, manuscript drafting; Malakhova MV — research planning and implementation; Bodoev IN — literature analysis, data analysis, manuscript drafting; Vedekhina TS — research implementation, data interpretation; Veselovsky VA — research implementation, data analysis; Klimina KM — research implementation, data analysis and interpretation; Varizhuk AM — research planning and implementation, data interpretation; Shitikov EA — research planning, literature analysis, data analysis, manuscript drafting.

✉ **Correspondence should be addressed:** Egor A. Shitikov
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; eshitikov@mail.ru

Received: 08.04.2022 **Accepted:** 30.04.2022 **Published online:** 15.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.024

Туберкулез, вызываемый микобактериями туберкулезного комплекса, представляет собой глобальную проблему для современного здравоохранения. По экспертным оценкам ВОЗ, в 2020 г. число умерших от заболевания возросло по сравнению с 2019 г. на 100 тыс. человек и составило 1,3 млн. В первую очередь это связано с уменьшением расходов на диагностику и лечение туберкулеза и повышенной нагрузкой на систему здравоохранения, вызванной пандемией COVID-19. Ожидается, что негативная тенденция сохранится в ближайшие несколько лет [1].

Несмотря на применение противотуберкулезной терапии, успех лечения туберкулеза, осложненного лекарственной устойчивостью, не превышает 60%. Повсеместно отмечаются случаи возникновения резистентности к новым препаратам, таким как линезолид, бедаквилин, клофозамин и т. д. [2]. В связи с этим актуальным становится поиск новых лекарственных препаратов, отличающихся принципиально иным механизмом действия, а также мишеней для противотуберкулезной терапии.

Одной из мишеней могут стать G-квадруплексы (G4) — неканонические вторичные структуры, формирующиеся в физиологических условиях гуанинодерживающими последовательностями ДНК и РНК. Структурная единица G4 — G-квартет — образован четырьмя гуаниновыми основаниями. Между собой G-квартеты удерживаются π - π -стекинг-взаимодействием, а также дополнительно стабилизируются катионами металлов [3].

Представленные структуры достаточно хорошо изучены у эукариотических организмов и играют важную роль в регуляции и поддержании стабильности генома [4]. В 2000-х гг. потенциальные квадруплекс-формирующие последовательности (putative quadruplex sequence, PQS) были обнаружены в геномах многочисленных бактерий и архей, однако их функциональная роль до сих пор до конца не исследована [5]. Установлено, что G4 могут влиять на различные аспекты физиологии бактерий, в том числе на выживание в неблагоприятных условиях, взаимодействие с макроорганизмом у патогенных бактерий, на антигенную изменчивость и т. д. [6].

G4-лиганды, часто представленные низкомолекулярными соединениями, способны связываться с квадруплексными последовательностями, тем самым влияя на их термическую стабильность, что в дальнейшем может приводить к нарушению действия различных белковых факторов и ферментов, функционально связанных с ДНК или РНК, и подавлять или активировать транскрипцию и трансляцию. К числу наиболее известных лигандов принадлежат

производное акридина BRACO-19 и катионный порфирин TMPyP4 (рис. 1). Возможность применения G4-лигандов в качестве потенциальных антимикробных соединений продемонстрирована для таких распространенных патогенов, как *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Mycobacterium tuberculosis* [6].

Для микобактерий туберкулеза, имеющих высокий GC-состав и значительную плотность PQS, исследование влияния G4-стабилизирующих лигандов на патоген представляется весьма перспективным. На бактериях уже показан ингибирующий эффект микромолярных концентраций известных лигандов с-exNDI-2, BRACO-19 и TMPyP4. В случае с с-exNDI-2 и BRACO-19 дополнительно продемонстрирован стабилизирующий эффект на отдельные квадруплексные последовательности, находящиеся в промоторных областях генов [7]. Для TMPyP4 установлено стабилизирующее действие на квадруплексы в генах, ассоциированных с вирулентностью [8].

Следует подчеркнуть, что во всех приведенных работах было исследовано влияние лигандов на отдельные G4-формирующие последовательности, причем наличие G4 всегда приводило к уменьшению экспрессии соответствующего гена под действием соединения. Ранее в нашей лаборатории был проанализирован транскриптомный ответ модельного микроорганизма *Mycobacterium smegmatis* MC²155 в ходе воздействия ингибирующих концентраций лигандов TMPyP4 (4 мкМ) и BRACO-19 (10 мкМ). Суммарно, изменение экспрессии было выявлено для 10 и 12% генов бактерии под действием TMPyP4 и BRACO-19 соответственно, однако статистической связи между дифференциально экспрессирующимися генами и наличием PQS обнаружено не было [9].

Целью работы было провести анализ влияния субингибирующих концентраций лигандов TMPyP4 (2 мкМ) и BRACO-19 (5 мкМ) на экспрессионный профиль *M. smegmatis* MC²155 и его сравнение с ранее полученными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм и условия культивирования

В исследовании использовали штамм *Mycobacterium smegmatis* MC²155. Культивировали при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, с использованием жидкой среды Миддлбрук 7Н9 (HiMedia; Индия) или твердой среды Миддлбрук 7Н11 (HiMedia; Индия) с добавлением 0,5% глицерина и 10% ростовой добавки

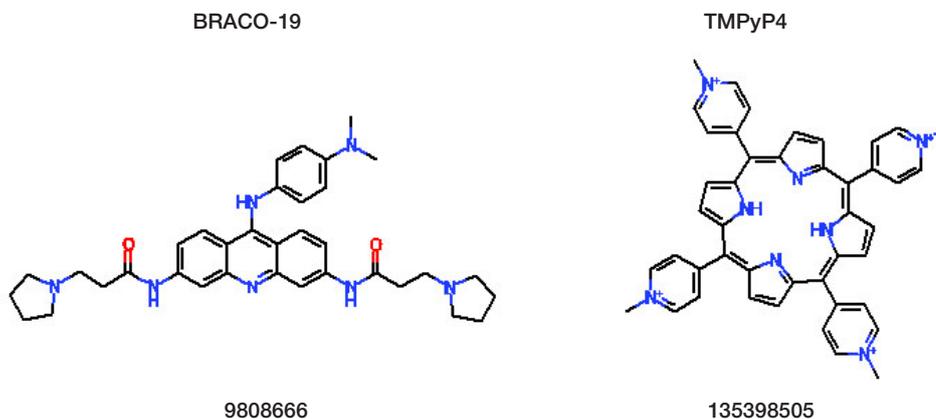


Рис. 1. Структурные формулы лигандов BRACO-19 и TMPyP4

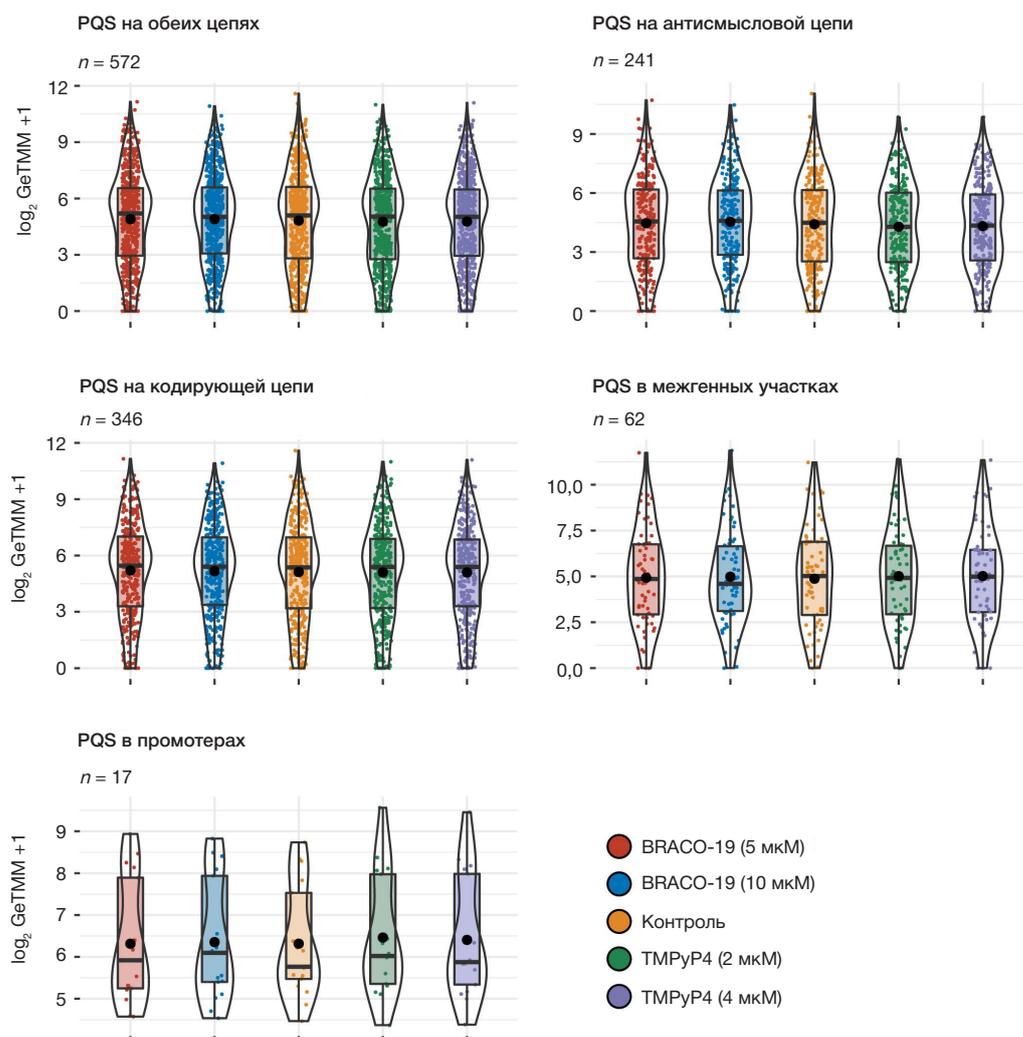


Рис. 3. Коробчатая диаграмма, показывающая различия в экспрессии генов, содержащих PQS, между контролем, при воздействии BRACO-19 и при воздействии TMPyP4. Число генов с PQS (n) не включает гены с низким количеством CPM (Counts Per Million), в случае межгенных участков включены оба гена. В рамке показаны верхний и нижний квартили, а линия внутри рамки показывает медиану. Черная точка указывает среднее значение. Games-Howell post hoc тест был использован для вычисления значения p

Картированные чтения были отнесены к генам с помощью featureCounts [15]. Дифференциальный анализ экспрессии генов выполняли с использованием пакета edgeR [16] для R. Гены с отсечкой частоты ложных обнаружений (FDR) 0,05 и порогом кратности изменения ($\log_2 \text{FC}$) 1] (т. е. ≥ 2 -кратное изменение) считали дифференциально экспрессируемыми. Для межвыборочного сравнения подсчеты были нормализованы с использованием усеченного среднего значения M с поправкой на длину гена [17]. Дальнейший анализ функционального обогащения терминов GO и путей KEGG для дифференциально экспрессируемых генов был выполнен с использованием пакета clusterProfiler [18], категории считали обогащенными, если $\text{FDR} \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние G4-стабилизирующих лигандов BRACO-19 и TMPyP4 на экспрессию генов *M. smegmatis* MC²155

Для оценки влияния лигандов BRACO-19 и TMPyP4 на экспрессию генов клетки *M. smegmatis* обрабатывали субингибирующими концентрациями соединений (5 мкМ и 2 мкМ соответственно) в течение 4 ч. Результаты РНК-

секвенирования сравнивали между собой, а также с ранее полученными данными.

Метод главных компонент показал кластеризацию повторов в каждом эксперименте, а также выраженную вариацию между обоими лигандами и контролем (рис. 2А). Однако в ходе анализа не было обнаружено существенной вариации между различными концентрациями одного лиганда.

Под действием BRACO-19 было идентифицировано 589 (316 \uparrow ; 273 \downarrow) и 865 (555 \uparrow ; 310 \downarrow) дифференциально экспрессированных генов, для 5 мкМ и 10 мкМ соответственно (рис. 2Б). Напротив, в случае с TMPyP4 обнаружено снижение числа дифференциально экспрессированных генов с 754 (337 \uparrow ; 417 \downarrow) до 702 (359 \uparrow ; 343 \downarrow) для концентраций 2 мкМ и 4 мкМ соответственно.

Влияние лигандов на экспрессию генов, связанных с потенциальными квадруплекс-формирующими последовательностями

Связь между изменением уровня экспрессии генов под действием лигандов и наличием потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей оценивали для следующих ранее установленных групп: PQS на обеих

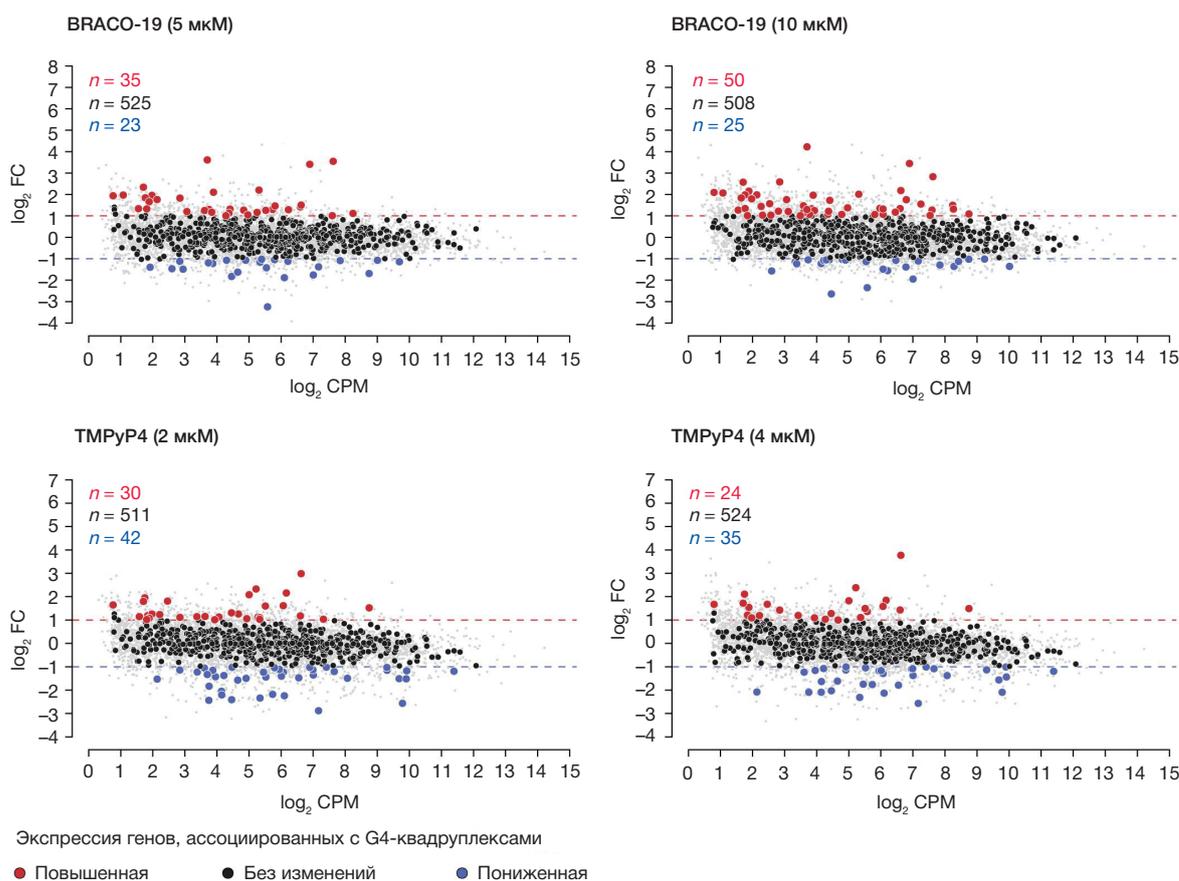


Рис. 4. График средней разницы (MD-plot) между уровнем изменения экспрессии ($\log_2 FC$) и средней экспрессией ($\log_2 CPM$) в генах, ассоциированных с потенциальными квадруплексами

цепях гена ($n = 665$) для 615 генов, PQS в смысловой цепи ($n = 267$) для 255 генов, PQS в матричной цепи ($n = 398$) для 360 генов, PQS в межгенных регионах ($n = 53$; 14/53 для двух генов), PQS в промоторных областях ($n = 17$) [9]. В ходе анализа для двух концентраций каждого из лигандов по сравнению с контрольными образцами не было выявлено статистически значимых различий ни для одной из представленных групп (Games-Howell post-hoc test $padj. >> 0,05$; рис. 3).

Число дифференциально экспрессированных генов, ассоциированных с квадруплексами, увеличивалось (58 \rightarrow 75) с повышением концентрации BRACO-19 (5 мкМ \rightarrow 10 мкМ), но уменьшалось (72 \rightarrow 59) при повышении концентрации TMPyP4 (2 мкМ \rightarrow 4 мкМ) (рис. 4).

Изменения в системе репликации и репарации под действием лигандов

Анализ результатов РНК-секвенирования показал, что под действием лигандов BRACO-19 и TMPyP4 профили генов репликативной и репарационной систем *M. smegmatis* существенно различались см. таблицу. Так, воздействие BRACO-19 приводило к повышению экспрессии генов, кодирующих ДНК-гиразы, ДНК-полимеразы транслезионного синтеза (ТЛС), хеликазы и белки системы репарации. ТЛС ДНК-полимеразы являются белками SOS-ответа и отвечают за активное восстановление хромосомы [19]. ДНК-гиразы (ДНК-топоизомеразы типа II) участвуют в синтезе ДНК, катализируя введение отрицательных суперскрученных витков [20]. Метилтрансфераза Ogt и ДНК-гликозилаза AlkA противодействуют повреждению ДНК в процессе алкилирования [21]. Стоит отметить, что

воздействие субингибирующей концентрации BRACO-19 (5 мкМ) приводило к изменению экспрессии меньшего числа генов. При этом повышение концентрации BRACO-19 вызывало увеличение экспрессии в два и более раза только генов *ogt* и *alkA*, что может свидетельствовать о дозозависимом эффекте.

В случае с TMPyP4 единственным геном системы репарации с повышенной экспрессией был *ssbb*. Ген *ssbb* кодирует белок, который препятствует комплементарному спариванию одноцепочечной ДНК и участвует в процессах репликации и рекомбинационной репарации. Кроме того, экспрессия ДНК-хеликазы RecQ повышалась под действием обоих лигандов.

Изменения в метаболических путях *M. smegmatis* MC2155, вызванные G4-лигандами

Анализ GO-категорий и KEGG-путей выявил обогащение ($FDR < 0,05$; рис. 5) категорий, связанных с транскрипцией (GO:0006351), процессом биосинтеза аргинина (GO:0006526), транспортом (GO:0006810), метаболизмом серы (msm00920), биосинтезом нерибосомных пептидных сидерофоров (msm01053) и АВС-транспортёрами (msm02010).

Как и в случае использования ингибирующих концентраций BRACO-19, воздействие меньшим количеством соединения привело к изменению единственного метаболического пути, связанного с железом. В ходе анализа была детектирована гиперэкспрессия генов, продукты которых ответственны за биосинтез сидерофоров, их транспорт и обратный захват. Напротив, гены, вовлеченные в запасание железа,

имели пониженную экспрессию. Важно отметить, что по уровню обогащения ответ бактериальной клетки на субингибирующие концентрации лиганда был сильнее.

Использование лиганда TMPyP4 привело к гиперэкспрессии генов транскрипционных факторов (GO:0006351) и путей, участвующих в метаболизме серы (msm00920). Последний путь был связан с обогащением транспортных систем при разных концентрациях соединения: гены категорий GO:0006810, msm02010 и msm00920 в большинстве пересекались между группами. В свою очередь гены, вовлеченные в биосинтез аминокислоты аргинина, характеризовались уменьшенной экспрессией, которая не зависела от концентрации лиганда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование является продолжением проведенной ранее работы, в которой был рассмотрен транскриптомный ответ *M. smegmatis* на действие ингибирующих концентраций G4-стабилизирующих соединений BRACO-19 и TMPyP4 [9]. В представленной работе в ходе воздействия субингибирующих концентраций лигандов была предпринята попытка найти взаимосвязь PQS с изменением экспрессии генов, а также определить метаболические пути, являющиеся первичными ответчиками.

В ходе биоинформатического анализа было определено, что воздействие даже субингибирующими концентрациями лигандов приводит к изменению экспрессии существенного числа генов (рис. 2). Соединения показали противоположные результаты: увеличение

концентрации лигандов приводило к увеличению (в случае с BRACO-19) и уменьшению (TMPyP4) числа дифференциально экспрессированных генов. Дальнейший анализ результатов не выявил убедительных доказательств значимого повышения или понижения регуляции генов, связанных с PQS, вызванных G4-лигандами, в том числе не удалось найти конкретных доказательств опосредованной лигандами G4-стабилизации, зависимой от концентрации (рис. 3). Кроме того, мы проанализировали общие эффекты лигандов, изучив специфические гены, которые имели схожий для обоих лигандов вектор изменения экспрессии. Однако даже для генов, регулируемых одинаково обоими лигандами, нам не удалось найти конкретных доказательств опосредованной лигандами G4-стабилизации и дозозависимых эффектов. В ходе анализа не удалось также подтвердить стабилизацию ранее описанных для *M. tuberculosis* квадруплексных структур, в связи с существенной разницей в геномных последовательностях *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

При анализе KEGG-путей и GO-категорий дозозависимый эффект тоже не был обнаружен. Все эффекты, наблюдаемые на уровне транскриптома и вызванные воздействием лигандов в субингибирующих концентрациях, коррелировали с таковыми при ингибирующих, результаты воздействия которых были опубликованы ранее [9] (рис. 5). Стоит отметить лишь систему метаболизма железа в случае с BRACO-19, показавшую больший уровень обогащения при воздействии субингибирующими концентрациями соединения. Данная система активируется в условиях дефицита железа, при окислительном и нитрозативном стрессах, а также в случае потребности в металлопротеинах, участвующих в

Таблица. Изменение уровня экспрессии генов системы репликации и репарации *M. smegmatis* под действием BRACO-19 и TMPyP4

Локус	Ген	Продукт	Экспрессия генов под действием BRACO-19 в сравнении с контролем		Экспрессия генов под действием TMPyP4 в сравнении с контролем	
			5 мкМ	10 мкМ	2 мкМ	4 мкМ
MSMEG_0005	<i>gyrB</i>	ДНК-гираза субъединица В	2,485372*	2,304708	-1,79363	-1,70249
MSMEG_0006	<i>gyrA</i>	ДНК-гираза субъединица А	2,152993	2,316561	-2,34404	-1,84273
MSMEG_1327	<i>recB</i>	Экзодезоксирибонуклеаза субъединица В	1,158257	1,240121	-2,16073	-2,2508
MSMEG_1620	<i>imuA'</i>	Гипотетический белок	1,957144	2,865713	1,419836	-1,08999
MSMEG_1622	<i>imuB</i>	Репаративная ДНК-полимераза	1,867917	2,435738	1,721681	1,944552
MSMEG_1633	<i>dnaE2</i>	ДНК-полимераза транслезионного синтеза	1,855874	2,529669	1,720836	1,865113
MSMEG_2442	<i>RNaseH2 (rnhB)</i>	Рибонуклеаза HII	1,845015	2,135989	1,353681	1,362699
MSMEG_3172	<i>dinB1</i>	ДНК-полимераза IV	2,069791	2,304246	1,066778	1,130623
MSMEG_3885	<i>helY</i>	РНК-хеликаза семейства DEAD/DEAH	2,540092	3,424716	-1,17839	-1,13342
MSMEG_4701	<i>ssbb</i>	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК	1,509562	1,910513	2,236647	2,367929
MSMEG_4925	<i>alkA</i>	Регулятор транскрипции, белок семейства Ada/ДНК-3-метиладенингликозилаза II	3,608202	8,892216	1,477495	1,539172
MSMEG_4928	<i>ogt</i>	Цистеин метилтрансфераза	4,145998	9,941453	1,106208	1,357626
MSMEG_5397	<i>recQ</i>	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза RecQ	3,156958	4,455866	2,107502	2,911045
MSMEG_5422	<i>mazG</i>	Пирофосфогидролаза	1,754292	1,586085	-2,46206	-2,19913
MSMEG_6443	<i>dinB3</i>	ДНК-полимераза IV	2,077001	2,867936	1,164152	1,261415
MSMEG_6896	<i>ssba</i>	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК	-1,70995	-2,71083	-1,27025	-1,32274

Примечание: * — жирным выделены изменения экспрессии, которые отвечают следующим критериям: изменение более чем в два раза и FDR < 0,05.

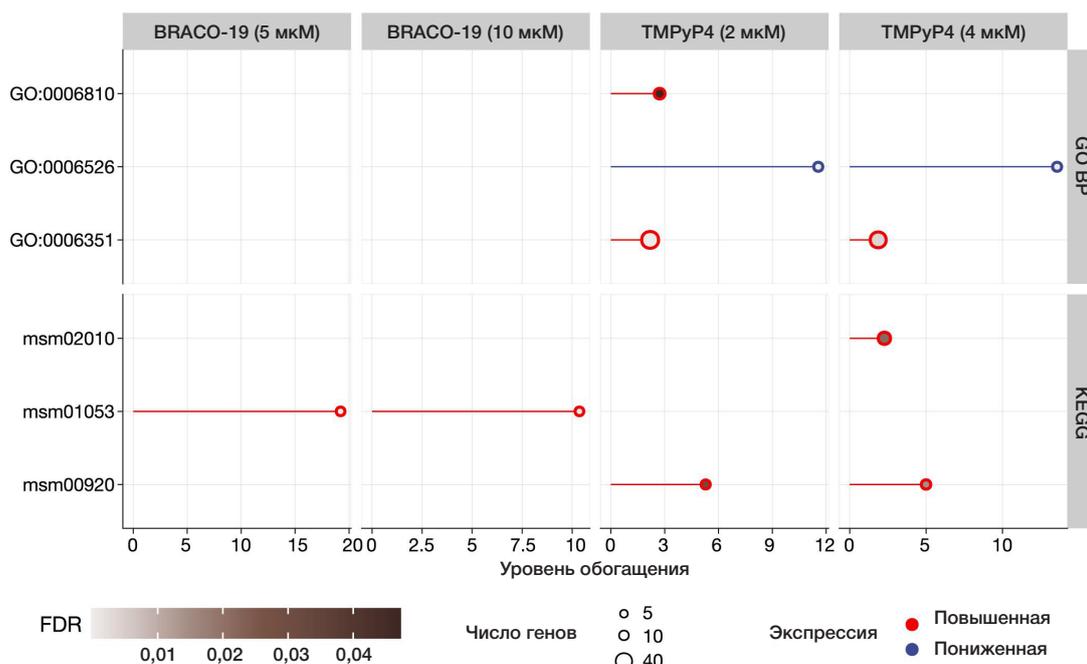


Рис. 5. GO-категории и KEGG-пути, обогащенные в образцах под действием различных концентраций BRACO-19 и TMPyP4. GO:0006810 — транспорт; GO:0006526 — биосинтез аргинина; GO:0006351 — ДНК-опосредованная транскрипция; msm02010 — ABC-транспортеры; msm01053 — биосинтез нерибосомных пептидов группы сидерофоров; msm00920 — метаболизм серы

репликации и репарации ДНК [22]. При субингибирующей концентрации BRACO-19 был перепредставлен путь биосинтеза нерибосомных пептидных сидерофоров (msm01053), включающий гены синтеза микобактина. Рассмотрение других систем пути выявило постепенное повышение экспрессии генов с увеличением концентрации лиганда.

Анализ генов системы репликации и репарации выявил единственный ген *recQ*, экспрессия которого была увеличена под действием субингибирующих концентраций BRACO-19 и TMPyP4. Для *E. coli* показано, что хеликаза RecQ способна разрешать квадруплексные структуры, однако белок RecQ в *M. smegmatis* не является гомологом белка из *E. coli* и отсутствует в *M. tuberculosis* [23]. Данное наблюдение говорит о необходимости дальнейшего исследования функций белка RecQ *M. smegmatis* на предмет его способности разрешать G4-структуры.

В дополнение следует отметить, что транскрипционный ответ микроорганизмов представляет собой сложное явление, модулируемое множественными факторами, включая специфичные системы регуляции, воздействие факторов внешней среды и др. Так, к примеру, в последнее время получены свидетельства того, что при определенных условиях квадруплексы, помимо ингибирующего действия, могут выступать в роли активаторов транскрипции. Для эукариотических организмов показано, что квадруплексы могут служить центрами связывания факторов транскрипции, изменять архитектуру хроматина, стабилизировать R-петли и т. д. [24]. Эксперименты на бактериях показали также, что стабилизация квадруплексов посредством производных нафталин диимида способна не только ингибировать

экспрессию у грамотрицательных микроорганизмов, но и усиливать ее у грамположительных, что указывает на двойственную природу квадруплекс-опосредованной регуляции [25]. Следует также отметить, что несмотря на то, что РНК-квадруплексы бактерий исследованы слабо, существуют свидетельства их наличия у микроорганизмов, как и их участия в регуляции биологических процессов [26]. Таким образом, разработка новых методов обнаружения и подтверждения квадруплексных структур, в том числе и протеомными экспериментами, в будущем обеспечит значительный прогресс в понимании роли отдельных G4 в регуляции генов.

ВЫВОДЫ

В настоящее время квадруплексы обнаружены в геномах значительного большинства микроорганизмов и, несомненно, являются важным элементом регуляции. Тем не менее в представленном исследовании не удалось выявить прямую связь между стабилизацией потенциальных квадруплексных структур и экспрессией генов, ассоциированных с ними. Оба соединения действовали на микроорганизм и приводили к изменению существенного количества транскриптов и метаболических путей. А обнаруженные изменения в генах факторов транскрипции и системы репликации и репарации, в случае использования лигандов, указывают на потенциальное действие на уровне РНК/ДНК, что согласуется с последними данными по квадруплекс-опосредованной регуляции генома. В свою очередь гиперэкспрессия гена хеликазы RecQ может служить основой для последующих исследований белка в качестве фермента, участвующего в разрешении квадруплексных структур.

Литература

1. Global Tuberculosis Report 2021 [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
2. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020; 75 (8): 2031.
3. Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem*. 2020; 2 (2): 123–36.
4. Masai H, Tanaka T. G-quadruplex DNA and RNA: Their roles in regulation of DNA replication and other biological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 531 (1): 25–38.
5. Bartas M, Cutová M, Brázda V, Kaura P, Št'Astný J, Kolomazník J, et al. The presence and localization of G-quadruplex forming sequences in the domain of bacteria. *Molecules*. 2019; 24 (9).
6. Yadav P, Kim N, Kumari M, Verma S, Sharma TK, Yadav V, et al. G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target. *Journal of Bacteriology*. 2021; 203 (13).
7. Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, et al. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Sci Rep*. 2017; 7 (1).
8. Mishra SK, Shankar U, Jain N, Sikri K, Tyagi JS, Sharma TK, et al. Characterization of G-quadruplex motifs in espB, espK, and cyp51 genes of mycobacterium tuberculosis as potential drug targets. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 698–706.
9. Shitikov E, Bespiatykh D, Malakhova M, Bespyatykh J, Bodoev I, Vedekhina T, et al. Genome-wide transcriptional response of mycobacterium smegmatis MC 2 155 to G-quadruplex ligands BRACO-19 and TMPyP4. *Front Microbiol*. 2022; 13.
10. Logsdon MM, Aldridge BB. Stable regulation of cell cycle events in mycobacteria: insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Front Microbiol*. 2018; 9 (MAR).
11. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015; 12 (4): 357–60.
12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25 (16): 2078–9.
13. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2016; 32 (2): 292–4.
14. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32 (19): 3047–8.
15. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014; 30 (7): 923–30.
16. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
17. Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Werken HJG, van Riet J, van Galen A, de Weerd V, et al. Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19 (1).
18. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16 (5): 284–7.
19. W Yang, Y Gao. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2018; 87: 239–61.
20. Mdluli K, Ma Z. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*. 2007; 7 (2): 159–68.
21. Yang M, Aamodt RM, Dalhus B, Balasingham S, Helle I, Andersen P, et al. The ada operon of Mycobacterium tuberculosis encodes two DNA methyltransferases for inducible repair of DNA alkylation damage. *DNA Repair*. 2011; 10 (6): 595–602.
22. Namouchi A, Gómez-Muñoz M, Frye SA, Moen LV, Rognes T, Tønjum T, et al. The Mycobacterium tuberculosis transcriptional landscape under genotoxic stress. *BMC Genomics*. 2016; 17 (1): 1–13.
23. Wu X, Maizels N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29 (8): 1765–71.
24. Robinson J, Raguseo F, Nuccio SP, Liano D, di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (15): 8419–31.
25. Cebrián R, Belmonte-Reche E, Pirota V, de Jong A, Morales JC, Freccero M, et al. G-quadruplex DNA as a target in pathogenic bacteria: efficacy of an extended naphthalene diimide ligand and its mode of action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021.
26. Shao X, Zhang W, Umar MI, Wong HY, Seng Z, Xie Y, et al. RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. *mBio*. 2020; 11 (1).

References

1. Global Tuberculosis Report 2021 [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
2. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020; 75 (8): 2031.
3. Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem*. 2020; 2 (2): 123–36.
4. Masai H, Tanaka T. G-quadruplex DNA and RNA: Their roles in regulation of DNA replication and other biological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 531 (1): 25–38.
5. Bartas M, Cutová M, Brázda V, Kaura P, Št'Astný J, Kolomazník J, et al. The presence and localization of G-quadruplex forming sequences in the domain of bacteria. *Molecules*. 2019; 24 (9).
6. Yadav P, Kim N, Kumari M, Verma S, Sharma TK, Yadav V, et al. G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target. *Journal of Bacteriology*. 2021; 203 (13).
7. Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, et al. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Sci Rep*. 2017; 7 (1).
8. Mishra SK, Shankar U, Jain N, Sikri K, Tyagi JS, Sharma TK, et al. Characterization of G-quadruplex motifs in espB, espK, and cyp51 genes of mycobacterium tuberculosis as potential drug targets. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 698–706.
9. Shitikov E, Bespiatykh D, Malakhova M, Bespyatykh J, Bodoev I, Vedekhina T, et al. Genome-wide transcriptional response of mycobacterium smegmatis MC 2 155 to G-quadruplex ligands BRACO-19 and TMPyP4. *Front Microbiol*. 2022; 13.
10. Logsdon MM, Aldridge BB. Stable regulation of cell cycle events in mycobacteria: insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Front Microbiol*. 2018; 9 (MAR).
11. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015; 12 (4): 357–60.
12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25 (16): 2078–9.
13. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput

- sequencing data. *Bioinformatics*. 2016; 32 (2): 292–4.
14. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32 (19): 3047–8.
 15. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014; 30 (7): 923–30.
 16. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
 17. Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Werken HJG, van Riet J, van Galen A, de Weerd V, et al. Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19 (1).
 18. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16 (5): 284–7.
 19. W Yang, Y Gao. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2018; 87: 239–61.
 20. Mdluli K, Ma Z. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*. 2007; 7 (2): 159–68.
 21. Yang M, Aamodt RM, Dalhus B, Balasingham S, Helle I, Andersen P, et al. The ada operon of Mycobacterium tuberculosis encodes two DNA methyltransferases for inducible repair of DNA alkylation damage. *DNA Repair*. 2011; 10 (6): 595–602.
 22. Namouchi A, Gómez-Muñoz M, Frye SA, Moen LV, Rognes T, Tønnum T, et al. The Mycobacterium tuberculosis transcriptional landscape under genotoxic stress. *BMC Genomics*. 2016; 17 (1): 1–13.
 23. Wu X, Maizels N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29 (8): 1765–71.
 24. Robinson J, Raguseo F, Nuccio SP, Liano D, di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (15): 8419–31.
 25. Cebrián R, Belmonte-Reche E, Pirota V, de Jong A, Morales JC, Freccero M, et al. G-quadruplex DNA as a target in pathogenic bacteria: efficacy of an extended naphthalene diimide ligand and its mode of action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021.
 26. Shao X, Zhang W, Umar MI, Wong HY, Seng Z, Xie Y, et al. RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. *mBio*. 2020; 11 (1).