

Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов, Д.И.Симакова

РОЛЬ МАЛЫХ РНК В КОНТРОЛЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕАЛИЗАЦИЮ ПАТОГЕННОСТИ *VIBRIO CHOLERAЕ*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону,
Российская Федерация

В настоящее время малые РНК бактерий с регуляторными функциями характеризуют как гетерогенную совокупность высокоструктурированных одноцепочечных РНК, обычно не транскрибирующихся в белки. Большую группу малых РНК составляют малые регуляторные РНК, функционирующие по механизму комплементарного взаимодействия оснований малой регуляторной РНК с матричными РНК бактерий. В обзоре приведено описание механизмов непосредственного участия малых РНК в реализации патогенных свойств, формировании биопленки и регуляции вирулентности штаммов *V. cholerae*. В частности, описаны Hfq-зависимые малые РНК, управляющие экспрессией генов, ответственных за вирулентность и формирование биопленки *V. cholerae*; представлено влияние малых РНК на систему секреции шестого типа; показано формирование везикул холерного вибриона, управляемого малой РНК, имеющих важное значение для колонизирующей способности холерных вибрионов. Приводится описание такого способа регуляции на уровне РНК, как «рибосвитчи» (РНК-переключатели).

Ключевые слова: малые РНК, регуляция генов, *Vibrio cholerae*, рибосвитч.

Корреспондирующий автор: Писанов Руслан Вячеславович, e-mail: pisanov_rv@antiplague.ru.

R.V.Pisanov, A.S.Vodop'yanov, D.I.Simakova

The Role of Small RNAs in Controlling Expression of Genes Involved in the Implementation of *Vibrio cholerae* Pathogenicity

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Currently, bacterial small RNAs with regulatory functions are characterized as a heterogeneous cluster of highly structured single-stranded RNAs which usually would not be translated into proteins. A large group of small RNAs consists of small regulatory RNAs functioning through the mechanism of complementary interaction between small regulatory RNA bases and bacterial messenger RNAs (mRNA). The review provides the description of direct participation of small RNA mechanisms in realization of pathogenic properties, biofilm formation and virulence regulation in *V. cholerae* strains. In particular, the Hfq-dependent small RNAs that control the expression of genes responsible for virulence and biofilm formation of *V. cholerae*, and the impact of small RNA on the secretion system of VI type are presented. We also characterized the small RNAs-controlled process of *V. cholerae* vesicles formation, which have a great significance for colonization ability of cholera vibrios. In addition, such method of regulation at RNA level as “riboswitches”, (RNA switches) is described.

Key words: small RNAs, gene regulation, *Vibrio cholerae*, riboswitch.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Ruslan V. Pisanov, e-mail: pisanov_rv@antiplague.ru.

Citation: Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. The Role of Small RNAs in Controlling Expression of Genes Involved in the Implementation of *Vibrio cholerae* Pathogenicity. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:36–39. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39

В качестве ключевых регуляторов генов в бактериальных клетках традиционно рассматривают белки, но не так давно были обнаружены системы контроля экспрессии генов с помощью малых РНК. Первые гены не кодирующих малых РНК (smallRNAs (sRNAs), non-codingRNAs (ncRNA)) с неизвестными на тот момент функциями были обнаружены в бактериальных плазидах более 30 лет назад [18, 19, 24]. В последние годы в зарубежной литературе наблюдается лавинообразный рост числа публикаций по малым РНК. Как закономерный итог, на сегодняшний день известны сотни бактериальных малых РНК, различающихся по структуре, механизмам действия и функциям. Общее количество известных малых РНК у наиболее изученной по этим молекулам бактерии – *Salmonella* около 100, у *E. coli* приближается к этому количеству. Заявлено об обнаружении более 600 малых РНК у *V. cholerae* при использова-

нии метода секвенирования последнего поколения (NGS) [7], что является рекордом среди всех бактерий с охарактеризованным малым РНКом.

Разнообразие малых РНК породило необходимость выделения этой группы молекул в отдельный класс регуляторов. В настоящее время все малые РНК бактерий с регуляторными функциями характеризуют как гетерогенную совокупность высокоструктурированных РНК, которые обычно не транскрибируются в белки (некоторые, редко – в короткие пептиды), варьируют по длине от 50 до 400 (иногда несколько больше) нуклеотидов [1, 15, 16, 19].

Большую группу малых РНК составляют малые регуляторные РНК, функционирующие по механизму комплементарного спаривания (гибридизации, т.е. образования водородных связей по типу «цепь нуклеиновых кислот (НК) – комплементарная ей НК цепь») оснований малой регуляторной РНК с ма-

тричными РНК (мРНК) бактерий. В отношении малых РНК гибридизация бывает двух типов:

- антисмысловая гибридизация РНК-нуклеотидов, происходящая с участием цис-малых РНК (cis-encoded small RNA), кодируемых в том же генном локусе, но на цепи ДНК, противоположной от кодирующей матричную РНК;

- несовершенная (неполная) гибридизация с участием транс-малых РНК (trans-encoded small RNA, tesRNA), выступающих в роли полифункциональных регуляторов, т.к. их последовательности могут иметь сходство к нескольким мРНК-мишеням [20].

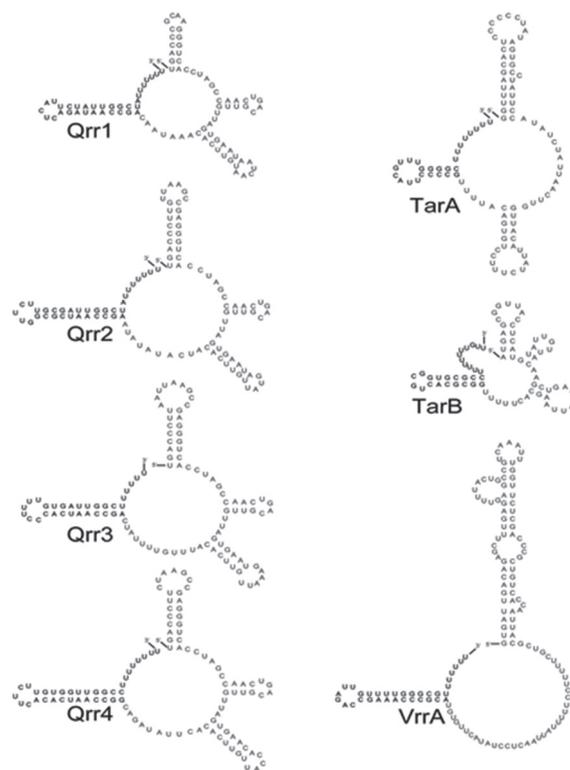
Образованные при участии малой РНК дуплексы совместно с белком-регулятором Hfq впоследствии гидролизуются такими рибонуклеазами, как РНКазы E [20]. Так осуществляется деградация матричной РНК и, как следствие, репрессируется синтез соответствующего белка.

Для посттрансляционной регуляции генов, управляемых малыми РНК, необходим РНК-связывающий белок, обозначаемый как Hfq. У холерных вибрионов Hfq-зависимые малые РНК управляют экспрессией генов, ответственных за вирулентность и формирование биопленки. Показано, что с Hfq связываются все известные на настоящий момент tesRNA, активирующие синтез σ^S -фактора РНК-полимеразы, так же, как и OMP-регулирующие sRNA MicA и RyhB, которые контролируют активность другого σ^S -фактора по механизму обратной связи. Данные σ -факторы, как показано, управляют системами вирулентности бактерий и, помимо этого, контролируют экспрессию до 60 % генного пула бактерий. Также на сальмонелле и кишечной палочке было показано, что Hfq связывается с транскодируемыми малыми РНК, регулирующими синтез ЛПС, системы контроля потребления железа, системы секреции 3-го типа, системы чувства кворума и прочими факторами, прямо или косвенно регулирующими вирулентность [7].

Есть свидетельства того, что некоторые из Hfq-ассоциированных tesRNA прямо или косвенно участвуют в регуляции вирулентности холерного вибриона [5, 9]. У холерных вибрионов известно два основных фактора патогенности: холерный токсин (СТ) и токсин ко-регулируемые пилы (TCP), способствующие межклеточной агрегации, колонизации кишечника макроорганизма и служащие рецептором для СТХф фага. Известна и система генной регуляции основных факторов патогенности, в которой основным регуляторным белком, контролирующим транскрипцию *ctxAB* и *tcpA-F*, является ToxT. Транскрипция ToxT активируется белками TsrH и TsrP, а также ToxR-трансмембранным белком, для работы которого необходим протеин ToxS, ассоциированный с внутренней мембраной. Под воздействием различных факторов внешней среды происходит изменение экспрессии факторов патогенности посредством TsrH-P или ToxR-S регуляции, которая, в свою очередь, находится под контролем комплекса AphA-B белков активаторов (рисунок

[11, 12]. Вышеописанная регуляция находится в непосредственной зависимости от состояния «quorum sensing» бактериальной культуры *V. cholerae* и управляется четырьмя малыми РНК, получившими название Qrr1-4. Экспериментально установлено, что штаммы, делетированные по этим РНК, не способны осуществлять продукцию холерогена, пилей адгезии и формировать биопленку. «Quorum sensing» (QS) – это процесс, при котором клетки взаимодействуют между собой для коррекции коллективного поведения в ответ на воздействия факторов внешней среды посредством аутоиндукторов [3].

Холерный вибрион производит и реагирует на два QS аутоиндуктора, ХАИ-1 (холера аутоиндуктор-1) и АИ-2 (аутоиндуктор-2), которые производятся белками CqsA и LuxS соответственно. ХАИ-1 – это (S)-3-гидрокситридекан-4-пентадион – синтезируется и используется большинством представителей рода *Vibrio*. АИ-2 – это 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион (ДПД), который производится многими видами бактерий и является универсальной сигнальной молекулой для межвидовых взаимодействий. Аутоиндукторы холерных вибрионов производятся с постоянной скоростью и, таким образом, могут служить в качестве показателя бактериального числа: при низком уровне концентрации АИ наблюдается низкая плотность клеток, при высоком уровне АИ – высокая. Для каждого аутоиндуктора на внутренней мембране имеется свой мембранный рецептор: CqsS для ХАИ-1 и гетеродимер LuxP/Q для АИ-2. Каждый рецептор передает сигнал регуляторному белку LuxO. При низкой плотности клеток происходит фосфорилирование



Вторичная структура малых РНК, отвечающих за вирулентность *V. cholerae* ctx⁺ tcp⁺ штаммов [2]

LuxO и активация четырех малых РНК Qrr1-4. Они функционируют совместно с Hfq, ингибируя трансляцию сразу нескольких матричных РНК генов, вовлеченных в регуляцию вирулентности *V. cholerae*: harR – глобального регулятора/репрессора генов патогенности, aphA – индуктора экспрессии генов патогенности и гена vca0939, стимулирующего формирование биопленки [2].

Система секреции шестого T6SS типа была ранее открыта как система доставки факторов патогенности у холерогенных штаммов *V. cholerae*. Также у холерных вибрионов она используется для уничтожения простейших и других бактериальных конкурентов в окружающей среде. В геноме холерного вибриона T6SS представлена одним большим VCA0107-VCA0124 и двумя малыми кластерами генов VC1415-VC1421, VCA0017-VCA0021. Достоверно установлено, что малые РНК Qrr1-4 управляют этой системой посредством репрессии. Открыто два механизма контроля. В первом случае при высокой плотности клеток культуры малые РНК Qrr1-4 блокируют трансляцию белка регулятора HarR посредством прямого «паринга» с мРНК как активатора генов T6SS малого кластера. Во втором случае при низкой плотности клеток культуры происходит прямая репрессия малыми РНК Qrr1-4 трансляции белка регулятора VasH (активатора генов малых кластеров), ген которого располагается в большом кластере T6SS [21].

В окружающей среде холерный вибрион может существовать как в свободной форме, так и в виде биопленки, ассоциированной с различными поверхностями (хитин, пластик, природные алюмосиликаты). Биопленочная форма холерного вибриона максимально устойчива к воздействию различных факторов окружающей среды и обладает повышенными вирулентными свойствами по сравнению со свободной формой. Рост биопленки на хитине стимулирует естественную восприимчивость вибрионов к чужеродной ДНК в качестве источника генетического разнообразия и пополнения арсенала факторов вирулентности. Так, активация компетенции холерных вибрионов контролируется двумя основными регуляторными белками: TfoX и HarR. TfoX регулирует гены, важные для связывания и перемещения экзогенной ДНК в периплазму клетки. При участии шаперона Hfq трансляция TfoX индуцируется малой РНК TfoR, концентрация которой возрастает при утилизации хитина клетками *V. cholerae* [8, 25]. Кроме того, TfoX в сочетании с HarR косвенно регулирует гены, ответственные за стабилизацию ДНК в периплазме и поглощение через внутреннюю мембрану с помощью ко-активации регулятора транскрипции QstR (VC0396) [8]. Прекращение синтеза малых РНК Qrr1-4 под воздействием аутоиндукционных сигналов в биопленке приводит к возрастанию концентрации белка HarR, что также индуцирует экспрессию каскада генов естественной компетентности клеток *V. cholerae* и, как следствие, восприимчивость к горизонтальному переносу генетической информации,

распространяемой как в виде свободной ДНК, так и в виде везикул. Мозаичная структура генома холерных вибрионов, по мнению некоторых исследователей, является результатом многочисленных горизонтальных событий переноса генов.

Везикулы наружной мембраны продуцируются большинством грамотрицательных бактерий в процессе их жизнедеятельности, в том числе и представителями рода *Vibrio*. В состав везикул входят ДНК, РНК, белки наружной мембраны и периплазмы, липополисахариды, фосфолипиды. У разных исследователей существуют различные теории о функциях бактериальных везикул. Одна из них – это перенос и доставка факторов патогенности к бактериальным или эукариотическим клеткам и способ выживаемости бактериальной биопленки, где везикулы выступают транспортерами протеолитических ферментов к удаленному субстрату и мишенью для фагов.

Процесс формирования везикул у холерного вибриона управляется посредством малой РНК, получившей название VrrA (*Vibrio regulatory RNA of ompA*) [23]. В геноме *V. cholerae* ее ген (140 п.н.) располагается в межгенной области vc1741-vc1743. Протеин OmpA (*outer membrane porin*) имеет важное значение для колонизирующей способности холерных вибрионов. Экспериментальным путем на модели мышей-сосунков установлено, что штаммы, делетированные по OmpA, обладают пониженной колонизирующей способностью (в 10 раз от исходного) и в то же время штаммы с инактивированным геном малой РНК vrrA, напротив, показывают пятикратное увеличение колонизирующей активности, что говорит о VrrA как о модуляторе вирулентности холерных вибрионов. Установлено, что малая РНК VrrA продуцируется и накапливается в постлогарифмическую фазу роста и посредством «паринга» связывается с матричной РНК ompA, препятствуя ее трансляции и блокируя синтез OmpA. Продукция везикул холерными вибрионами зависит от концентрации OmpA в клетке. Подавление синтеза OmpA через VrrA приводит к повышению продукции везикул культурой и, как следствие, повышению выживаемости биопленки [23]. VrrA снижает вирулентность *V. cholerae* путем подавления экспрессии гена *tcpA* посредством связывания с мРНК. Таким образом, VrrA, как репрессор колонизирующей активности вибрионов, может рассматриваться в качестве одной из мишеней при создании вакцинных штаммов.

Одним из способов регуляции на уровне РНК являются так называемые «рибосвитчи» или же РНК-переключатели. При этом способе регуляции «малая РНК» фактически располагается в составе матричной РНК перед началом кодирующей части гена. Принципиальной особенностью работы рибосвитча является изменение пространственной структуры РНК при связывании с определенным лигандом [4].

Например, именно по такому пути происходит регуляция синтеза глицина у сенной палочки: избыток глицина приводит к формированию шпильки в области посадки рибосомы на матричную РНК, что

блокирует процесс трансляции [17]. Позже было показано, что регуляция синтеза глицина происходит аналогичным путем и у холерного вибриона [14].

Известно, что циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) является одним из универсальных регуляторов биохимических процессов, происходящих в микробной клетке. У *V. cholerae* цГМФ регулирует такие процессы, как подвижность и образование биопленки.

Группой авторов при изучении кристаллической структуры показано, что цГМФ является специфическим лигандом для гена *tfoX* у *V. cholerae* и регулирует его трансляцию по принципу рибосвитча [22]. Вместе с тем ранее было показано, что указанный ген ответственен за образование биопленок у холерного вибриона. Это позволило сделать вывод о том, что регуляция образования пленкообразования у *V. cholerae* происходит с помощью рибосвитча [13]. При этом замена одного нуклеотида способна изменять связывание матричной РНК гена *vpvC* с цГМФ, приводя к образованию ругозных вариантов *V. cholerae* [6]. Последующие исследования показали, что у возбудителя холеры цГМФ-рибосвитч регулирует трансляцию гена *gfpA*, ответственного за колонизацию и способствующего присоединению холерных вибрионов к хитину [10].

Исходя из различных литературных данных зарубежных исследователей, можно сделать вывод о непосредственном участии малых РНК в реализации патогенных свойств и регуляции вирулентности холерогенных штаммов *V. cholerae*. Но даже сегодня изучение малых РНК сопряжено с различного рода трудностями. Практически не разработана унифицированная система для выделения малых РНК и Hfq-ассоциированных *tesRNA*, а методическая база по работе с малыми РНК с учетом СП 1.3.1285-03 (Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности) полностью отсутствует. Тем не менее, в нашей стране работы по использованию малых РНК как маркеров вирулентности у разных штаммов *V. cholerae* еще не осуществлялись, но, несомненно, выглядят многообещающими в свете последних научных изысканий.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arraiano C.M., Fialho A.M. O Mundo do RNA: Novos Desafios e Perspectivas Futuras. Lidel: Lisboa-Porto; 2007.
2. Bardill J.P., Hammer B.K. Non-coding sRNAs regulate virulence in the bacterial pathogen *Vibrio cholerae*. *RNA Biol.* 2012; 9(4):392–401. DOI: 10.4161/ma.19975.
3. Bardill J.P., Zhao X., Hammer B.K. The *Vibrio cholerae* quorum sensing response is mediated by Hfq-dependent sRNA/mRNA base pairing interactions. *Mol. Microbiol.* 2011; 80(5):1381–94. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07655.x.
4. Bastet L., Dube A., Masse E., Lafontaine D.A. New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol. Microbiol.* 2011; 80:1148–54. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07654.x.
5. Bejerano-Sagie M., Xavier K.B. The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(2):189–98. DOI: 10.1016/j.mib.2007.03.009.
6. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation

in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):995–1007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x.

7. Chao Y., Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(1):24–33. DOI: 10.1016/j.mib.2010.01.001.

8. Dalia A.B., Lazinski D.W., Camilli A. Identification of a membrane-bound transcriptional regulator that links chitin and natural competence in *Vibrio cholerae*. *MBio.* 2014; 5(1):1028–33. DOI: 10.1128/mBio.01028-13.

9. Hammer B.K., Bassler B.L. Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(27):1145–9. DOI: 10.1073/pnas.0703860104.

10. Kariisa A.T., Weeks K., Tamayo R. The RNA Domain VcI Regulates Downstream Gene Expression in Response to Cyclic Diguanylate in *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2016; 11(2):1484–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0148478.

11. Kovacicova G., Lin W., Skorupski K. *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the *tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):129–42. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04121.x.

12. Kovacicova G., Skorupski K. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(2):393–407. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02518.x.

13. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 60(2):331–48. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05106.x.

14. Lipfert J., Das R., Chu V.B., Kudaravalli M., Boyd N., Herschlag D., Doniach S. Structural transitions and thermodynamics of a glycine-dependent riboswitch from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2007; 365(5):1393–406. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.10.022.

15. Liu J.M., Camilli A. A broadening world of bacterial small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(1):18–23. DOI: 10.1016/j.mib.2009.11.004.

16. Liu J.M., Camilli A. Discovery of bacterial sRNAs by high-throughput sequencing. *Methods Mol. Biol.* 2011; 733:63–79. DOI: 10.1007/978-1-61779-089-8_5.

17. Mandal M., Lee M., Barrick J.E., Weinberg Z., Emilsson G.M., Ruzzo W.L., Breaker R.R. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science.* 2004; 306(5694):275–9. DOI: 10.1126/science.1100829.

18. Massé E., Majdalani N., Gottesman S. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6(2):120–4. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00027.

19. Narberhaus F., Vogel J. Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere. *Mol. Microbiol.* 2009; 74(2):261–9. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06869.x.

20. Repoila F., Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol. Cell.* 2009; 101(2):117–31. DOI: 10.1042/BC20070137.

21. Shao Y., Bassler B. L. Quorum regulatory small RNAs repress type VI secretion in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2014; 92(5):921–30. DOI: 10.1111/mmi.12599.

22. Smith K.D., Lipchock S.V., Ames T.D., Wang J., Breaker R.R., Strobel S.A. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16(12):1218–23. DOI: 10.1038/nsmb.1702.

23. Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.

24. Waters L.S., Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell.* 2009; 136(4):615–28. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.043.

25. Yamamoto S., Izumiya H., Mitobe J., Morita M., Arakawa E., Ohnishi M., Watanabe H. Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the *tfoX* gene, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(8):1953–65. DOI: 10.1128/JB.01340-10.

Authors:

Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 17.08.16.