

На правах рукописи

БУРЕНИНА Ольга Юрьевна

**Малые некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК из *Bacillus subtilis*:
сравнительный анализ свойств и функций**

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2014

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в Институте фармацевтической химии Марбургского Университета имени Филиппа (г. Марбург, Германия) в группе профессора Р. Хартманна.

Научный руководитель:

Кубарева Елена Александровна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Туницкая Вера Леонидовна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Кульбачинский Андрей Владимирович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Отдела молекулярной генетики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Ведущая организация:

Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится 17 июня 2014 года в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, НИИ ФХБ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан ___ мая 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции является одним из важнейших механизмов в клетках прокариот. До недавнего времени считалось, что данный процесс контролируется в первую очередь факторами белковой природы, а также зависит от особенностей конкретных промоторов ДНК. Неожиданным стало открытие нового класса малых некодирующих РНК (нкРНК), так называемых 6S РНК, которые способны ингибировать транскрипцию за счет непосредственного связывания с холоферментом РНК-полимеразы (РНКП) и блокирования её активного центра (*Wassarman et al., 2000*). Так, в *E. coli* в экспоненциальной фазе роста клеток 6S РНК практически отсутствует, в то время как при переходе в стационарную фазу уровень экспрессии 6S РНК резко возрастает, что приводит к ингибированию транскрипции большинства генов «домашнего хозяйства». Уникальной особенностью 6S РНК является возможность синтеза на её матрице коротких транскриптов – пРНК (от англ. «product RNA», pRNA), которые остаются связанными с 6S РНК благодаря комплементационным взаимодействиям. Образующийся комплекс 6S РНК:пРНК теряет сродство к РНКП, «свободный» фермент вновь способен вести транскрипцию, а 6S РНК и пРНК подвергаются деградации (*Wassarman et al., 2006*).

Кроме *E. coli* наличие гена 6S РНК (*ssrS*) предполагается более чем в 130-ти видах бактерий (*Barrick et al., 2005*), но только для 16-ти из них этот факт подтвержден экспериментально. Немногочисленные данные, известные для 6S РНК из этих бактериальных систем, свидетельствуют о возможном отличии свойств и функций их 6S РНК от 6S РНК *E. coli*. Наиболее интересным фактом является существование двух различных 6S РНК (6S-1 и 6S-2) в грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*. 6S-1 РНК экспрессируется, главным образом, в стационарной фазе роста клеток, а максимальная экспрессия 6S-2 РНК приходится на экспоненциальную фазу (*Barrick et al., 2005*). Причины «появления» дополнительной 6S-2 РНК в условиях активного роста и деления клеток, а также её свойства и функции неизвестны и требуют детального исследования.

Аналоги 6S РНК были найдены и в клетках высших эукариот – Alu РНК человека и B2 РНК мыши. Общность функциональных свойств этих нкРНК позволяет использовать 6S РНК *B. subtilis* в качестве модели для понимания основ нкРНК-зависимых механизмов регуляции транскрипции.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось сравнение свойств и функций малых некодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать способность 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* ингибировать транскрипцию *in vitro*,
- сравнить сродство 6S-1 и 6S-2 РНК к РНКП *B. subtilis*,

- установить возможность синтеза РНК-полимеразой коротких транскриптов (пРНК) на матрице 6S-1 и 6S-2 РНК,
- изучить влияние 6S-1 и/или 6S-2 РНК на экспрессию белков *B. subtilis in vivo*.

Научная новизна и практическая значимость работы. В рамках исследования впервые было показано, что 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* способны специфически ингибировать *in vitro* транскрипцию модельных промоторов различных генов *B. subtilis*. Все выбранные промоторы являлись σ^A -зависимыми¹ и содержали в стартовой позиции (+1) остаток dG или dA. Вне зависимости от наличия/отсутствия динуклеотида d(TG) в -12 положении и отличий -10 и -35 промоторных элементов от консенсусных последовательностей обе 6S РНК демонстрировали примерно одинаковую эффективность ингибирования транскрипции. Показано, что каждая из 6S РНК образует только один специфический комплекс с холоферментом РНКП *B. subtilis*, стабильный при добавлении гепарина как конкурирующего агента за связывание с ферментом. Определены константы диссоциации комплексов 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП. Их значения ($K_d(6S-1 \text{ РНК:РНКП}) = 460 \pm 50 \text{ нМ}$ и $K_d(6S-2 \text{ РНК:РНКП}) = 400 \pm 60 \text{ нМ}$) свидетельствуют о примерно одинаковом сродстве обеих 6S РНК к ферменту.

Впервые в условиях *in vitro* продемонстрирован синтез РНК-полимеразой коротких транскриптов на матрице 6S-1 и 6S-2 РНК и определены нуклеотидные последовательности образующихся пРНК. Транскрипция пРНК_{6S-1} начинается с остатка С40 в 6S-1 РНК, длина преобладающих транскриптов составляет 14 нуклеотидных остатков (н.о.). Стартовым нуклеотидом в 6S-2 РНК является остаток U41, наиболее эффективно синтезируются 13-16-звенные пРНК_{6S-2}. В случае 6S-2 РНК зафиксированы и более протяженные транскрипты длиной до 26 н.о. Обнаружено, что эффективность их синтеза прямо пропорциональна концентрации аденозинтрифосфата (АТР).

Как пРНК_{6S-1}, так и пРНК_{6S-2} образуют комплексы с комплементарной 6S РНК. Установлено, что длина пРНК играет ключевую роль при формировании дуплекса с 6S РНК и блокировании доступа к ней РНКП. Только 14-звенная пРНК_{6S-1} может образовывать стабильный комплекс с 6S-1 РНК, с уменьшением длины транскриптов стабильность комплексов резко падает. В случае 6S-2 РНК только комплексы с олигорибонуклеотидами длиной 20 н.о. не подвергаются диссоциации в присутствии РНКП. Вероятно, это связано с большим числом остатков А и U в пРНК_{6S-2} по сравнению с пРНК_{6S-1}.

Изучено влияние делеций генов *bsrA* или/и *bsrB* (кодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК, соответственно) и изменения их локализации в геноме *B. subtilis* на жизнеспособность и скорость роста клеток. Только клеточная линия с делецией обоих генов демонстрировала замедление скорости роста при переходе из экспоненциальной в

¹ Субъединица σ^A РНКП *B. subtilis* является гомологом σ^{70} -субъединицы РНКП *E. coli*.

стационарную фазу роста клеток. В результате анализа полных протеомов мутантных клеточных линий в сравнении с клетками дикого типа установлено, что 6S-1 и 6S-2 РНК оказывают существенное влияние на экспрессию многих белков. Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF идентифицирован ряд белков, экспрессия которых подавляется в присутствии обеих 6S РНК (AhpC, KatA, MntA, Mdh, RplJ, SufC, TriA, YvyD) или только 6S-2 РНК (AcoB, GapA и PyrG).

Полученные в настоящей работе данные о свойствах 6S РНК расширяют знания о принципах регуляции транскрипции. Результаты исследования могут быть использованы для объяснения механизмов взаимодействия эукариотических некодирующих РНК с РНК-полимеразой.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в международных периодических изданиях. Результаты были представлены на рабочих совещаниях «Enzymes and enzyme complexes acting on nucleic acids» (Вильнюс, Литва, май 2010), «Global and mechanistic approaches in nucleic acid biology» (Санкт-Петербург, Россия, сентябрь 2013) и отчетной конференции «Enzymes and multienzyme complexes acting on nucleic acids» (Гиссен, Германия, сентябрь 2010), проводимых в рамках международной программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых»; на 3-ей конференции «International Giessen Graduate School for the Life Sciences» (Гиссен, Германия, сентябрь 2010), 6-том симпозиуме «Nucleic Acids Chemistry and Biology» (Кембридж, Великобритания, сентябрь 2011), рабочем совещании «Sensory and regulatory RNAs in prokaryotes» (Кассель, Германия, сентябрь 2011), конференции «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, апрель 2013) и 38-ом конгрессе FEBS «Mechanisms in Biology» (Санкт-Петербург, Россия, июль 2013).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы (посвящен регуляции транскрипции генов прокариот и эукариот с помощью нкРНК), обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы и список литературы. Материал иллюстрирован 80 рисунками, 14 таблицами и 3 схемами. Библиографический указатель включает в себя 155 цитированных работ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Характеристика объектов исследования

Объектами изучения в данной работе являются некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* длиной 190 и 203 н.о., соответственно, впервые выделенные в 2002 г. при иммуносоосаждении с РНКП *B. subtilis* (Suzuma et al., 2002; Ando et al., 2002). Обе 6S РНК *B. subtilis* с высокой вероятностью образуют характерную для 6S РНК

E. coli вторичную структуру, представляющую собой нерегулярную двойную спираль с обширным расплетенным участком в центре (Trotochaud, Wassarman, 2005).

6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* были получены ферментативным синтезом с помощью РНКП фага T7. В качестве матриц для транскрипции использовали плазмиды, сконструированные на основе вектора pUC18, которые содержали ген *bsrA* или *bsrB* (кодирующий 6S-1 или 6S-2 РНК, соответственно) под контролем T7-промотора.

Гомогенный препарат холофермента σ^A -РНКП *B. subtilis* был выделен по методике, разработанной в сотрудничестве с лабораторией проф. М. Салас (Центр молекулярной биологии имени С. Очоа, Автономный университет Мадрида, Испания). Принцип выделения РНКП из клеток дикого типа *B. subtilis* NA110 основан на различной растворимости целевого белка в присутствии ПЭГ-6000, NaCl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Выделение РНКП после двух последовательных циклов осаждения-растворения проводили методом хроматографии низкого давления на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и ДНК-целлюлозой. Для сравнительной характеристики эффективности транскрипции с модельных промоторов генов *B. subtilis* использовали препарат холофермента РНКП *B. subtilis*, содержащий дополнительную последовательность из 10 остатков гистидина на С-конце β' -субъединицы. Выделение рекомбинантного белка проводили по упрощенной методике, описанной в работе (Anthony et al. 2000), методом аффинной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе.

Для изучения влияния 6S-1 и 6S-2 РНК на экспрессию белков *B. subtilis* в условиях *in vivo* использовали мутантные клеточные линии *B. subtilis* PY79 с делециями или измененной локализацией генов *bsrA* и/или *bsrB*, любезно предоставленные проф. Р. Хартманном (Институт фармацевтической химии, Марбургский Университет имени Филиппа, г. Марбург, Германия).

2. Изучение свойств 6S-1 и 6S-2 РНК *in vitro*

2.1. Комплексообразование 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП

Характерной чертой 6S РНК является специфическое связывание РНКП с образованием стабильного комплекса 6S РНК:РНКП, аналогичного «открытому» комплексу фермента с промотором ДНК. Для проверки способности 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* взаимодействовать с полимеразой изучали комплексообразование полученных T7-транскрипцией 5'-[^{32}P]-меченных 6S РНК и холофермента РНКП *B. subtilis*. Методом «торможения в геле» в неденатурирующих условиях зафиксировано образование в каждом случае единственного комплекса с ферментом, стабильного в присутствии возрастающих избытков гепарина (предотвращающего неспецифические взаимодействия). Сродство 6S-1 и 6S-2 РНК к РНКП оценивали по зависимости эффективности связывания фиксированного количества РНК (100 нМ) от концентрации белка (50-3000 нМ) (рис. 1А). Определены равновесные константы диссоциации (K_d) образующихся комплексов 6S-1 РНК:РНКП (рис. 1Б) и

6S-2 РНК:РНКП. Они имели сравнимые значения (460 ± 50 нМ и 400 ± 60 нМ, соответственно) в пределах погрешности эксперимента.

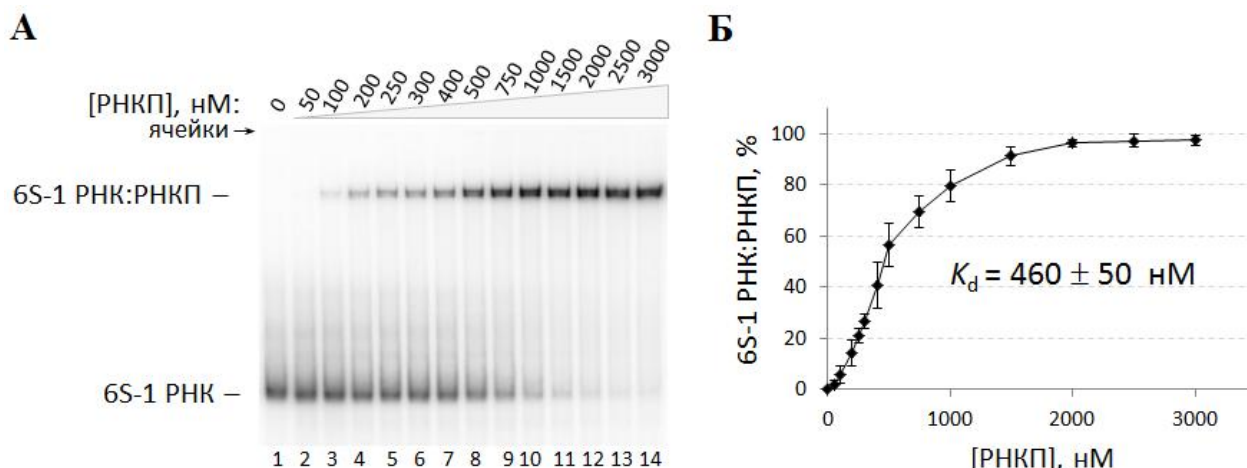


Рис. 1. Комплексообразование 6S-1 РНК (100 нМ) с холоферментом РНКП (50-3000 нМ) в присутствии 100 нг/мкл гепарина (дорожки 2-14). Дорожка 1 – исходная 6S-1 РНК. (А) Радиоавтограф 5%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. (Б) График зависимости степени образования комплекса 6S-1 РНК:РНКП от концентрации РНКП.

2.2. Конкуренция между 6S-1/6S-2 РНК и промоторами ДНК в условиях транскрипции *in vitro*

Основной функцией 6S РНК является ингибирование транскрипции вследствие конкуренции с промоторами ДНК за связывание с активным центром РНКП (схема 1).

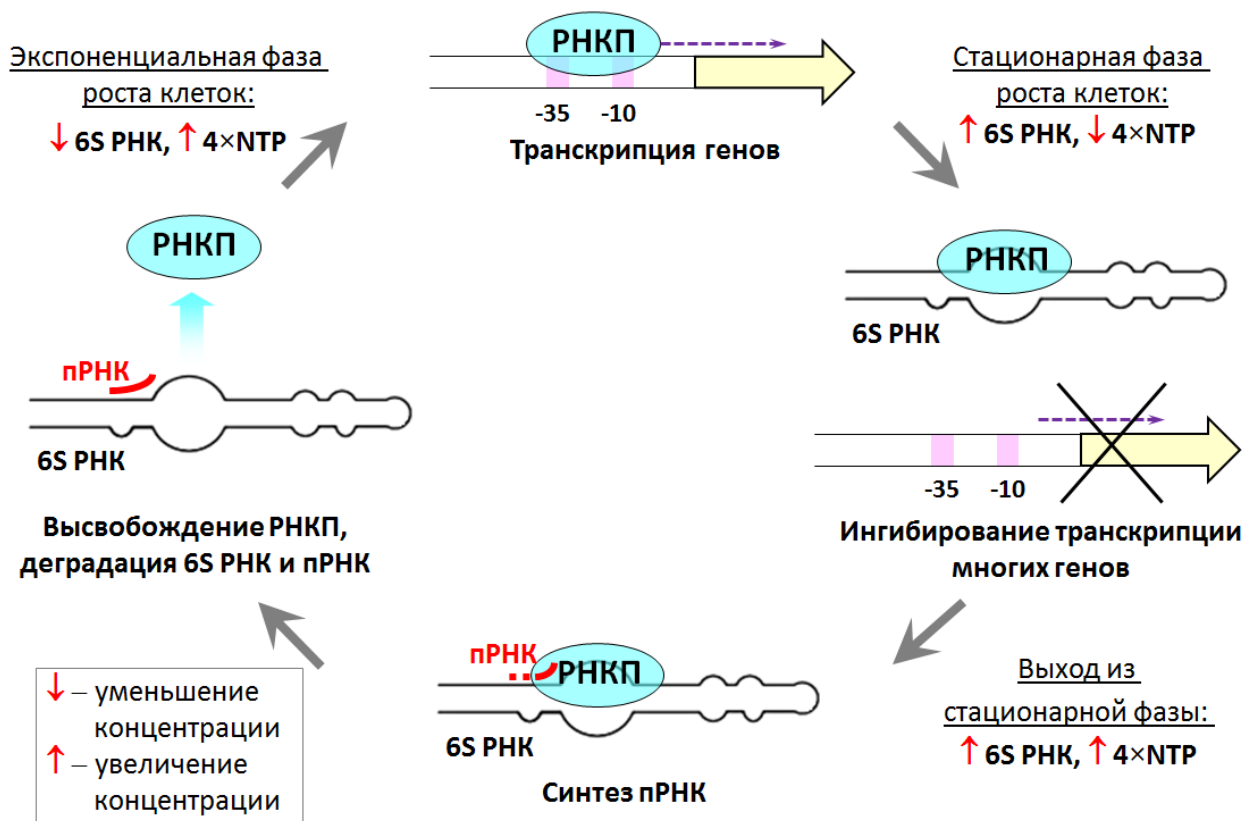


Схема 1.

Обладают ли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* этой способностью? Была изучена транскрипция *in vitro* с природных промоторов восьми различных генов: *rrnB*, *rrnO*, *veg*, *tuf*, *argC*, *appD* и *cspB* *B. subtilis* и C2 фага $\phi 29$ в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ для детекции синтезирующихся транскриптов. В качестве матриц для транскрипции использовали полученные методом ПЦР ДНК-фрагменты длиной 200-400 нуклеотидных пар, содержащие промоторные области того или иного гена. Пять из выбранных промоторов содержат расширенный -10 элемент. Стартовой точкой транскрипции для четырех из восьми промоторов является остаток dA, и для трех – dG². Промотор гена C2 фага $\phi 29$ содержит две альтернативные стартовые точки транскрипции dA (+1) и dT (+2). Добавление в реакционную смесь каждой из 6S РНК приводило к заметному ингибированию транскрипции с промоторов всех рассматриваемых генов со сравнимой эффективностью (рис. 2).

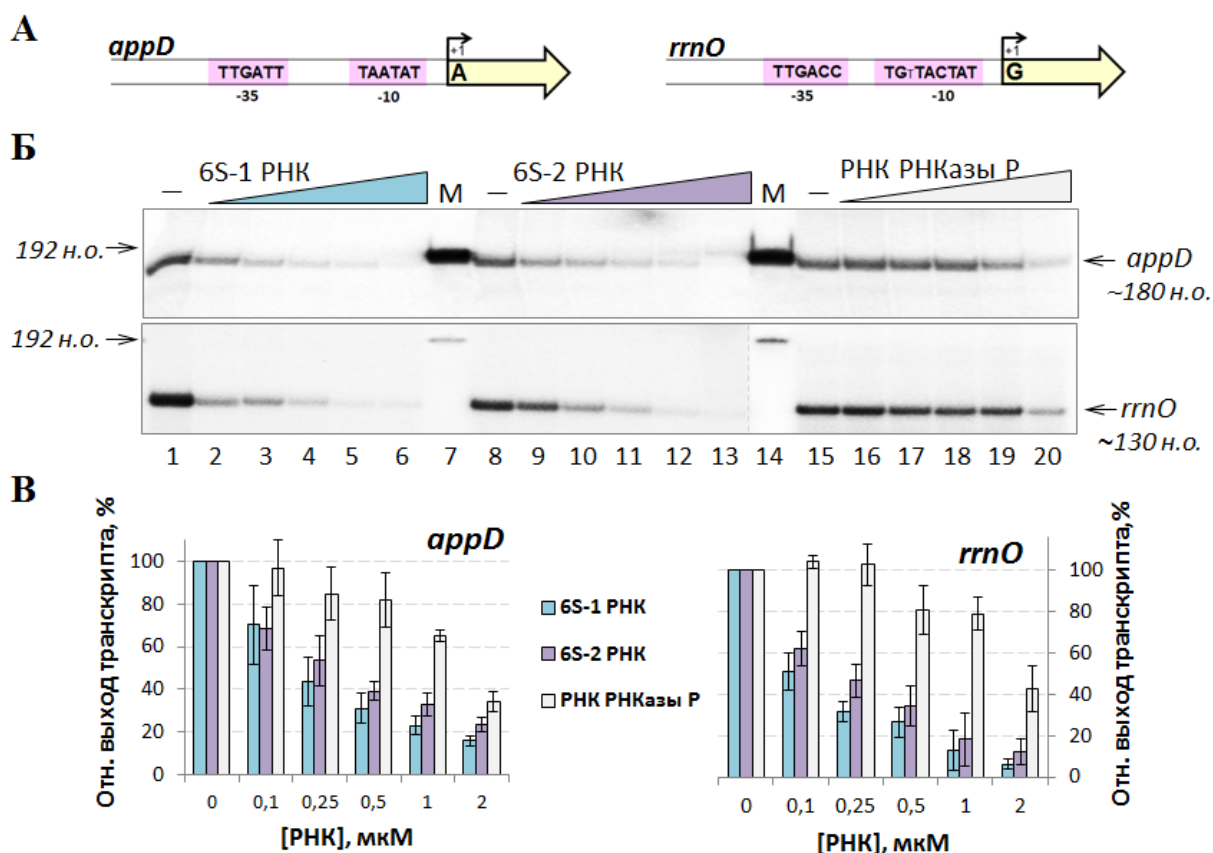


Рис. 2. Сравнительный анализ ингибирования транскрипции с промоторов генов *appD* и *rrnO* в присутствии 6S-1 РНК, 6S-2 РНК или РНК РНКазы Р. (А) Организация промоторных областей генов *appD* и *rrnO* *B. subtilis*. Стрелками указаны направления и стартовые точки транскрипции. (Б) Результаты транскрипции *in vitro* с промоторов генов *appD* (верхняя панель) и *rrnO* (нижняя панель). Радиоавтографы 5%-ных ПААГ, содержащих 7 М мочевины. Дорожки 1, 8, 15 – транскрипция в отсутствие нкРНК. Дорожки 2-6, 9-13 и 16-20 – различные концентрации (0,1; 0,25; 1 и 2 мкМ) 6S-1 РНК, 6S-2 РНК и РНК РНКазы Р, соответственно. Дорожки 7 и 14 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'- ^{32}P -меченная 6S-1 РНК). (В) Диаграммы ингибирования транскрипции в присутствии возрастающих количеств 6S-1 РНК (темно-серая), 6S-2 РНК (серая) и РНК РНКазы Р (белая). За 100% принимали выход транскрипта в отсутствие нкРНК.

² В клетках *B. subtilis* 56% всех промоторов содержат остаток dA в +1 положении, 38% - dG, 4,5% - dT и 1,5% - dC (Krasny et al., 2008).

Присутствие в реакционной смеси нкРНК рибонуклеазы Р (РНКазы Р) *B. subtilis*, которая не способна взаимодействовать с РНКП, существенно снижало выход продуктов транскрипции (дорожки 16-20 на рис. 2Б) только при её максимальной концентрации. Таким образом, обе 6S РНК *B. subtilis* способны специфически ингибировать транскрипцию *in vitro*.

2.3. Особенности взаимодействия РНКП с 6S-1 и 6S-2 РНК: синтез пРНК

Транскрипция РНК на РНК-матрице нехарактерна для ДНК-зависимой РНК-полимеразы и является исключительной особенностью фермента, проявляемой в случае 6S РНК. Необходимо было проверить возможность транскрипции пРНК на матрицах 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*. Комплексообразование обеих 6S РНК с холоферментом РНКП *B. subtilis* проводили в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов (4×NTP) и [α - 32 P]УТР. Продукты транскрипции анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 3А).

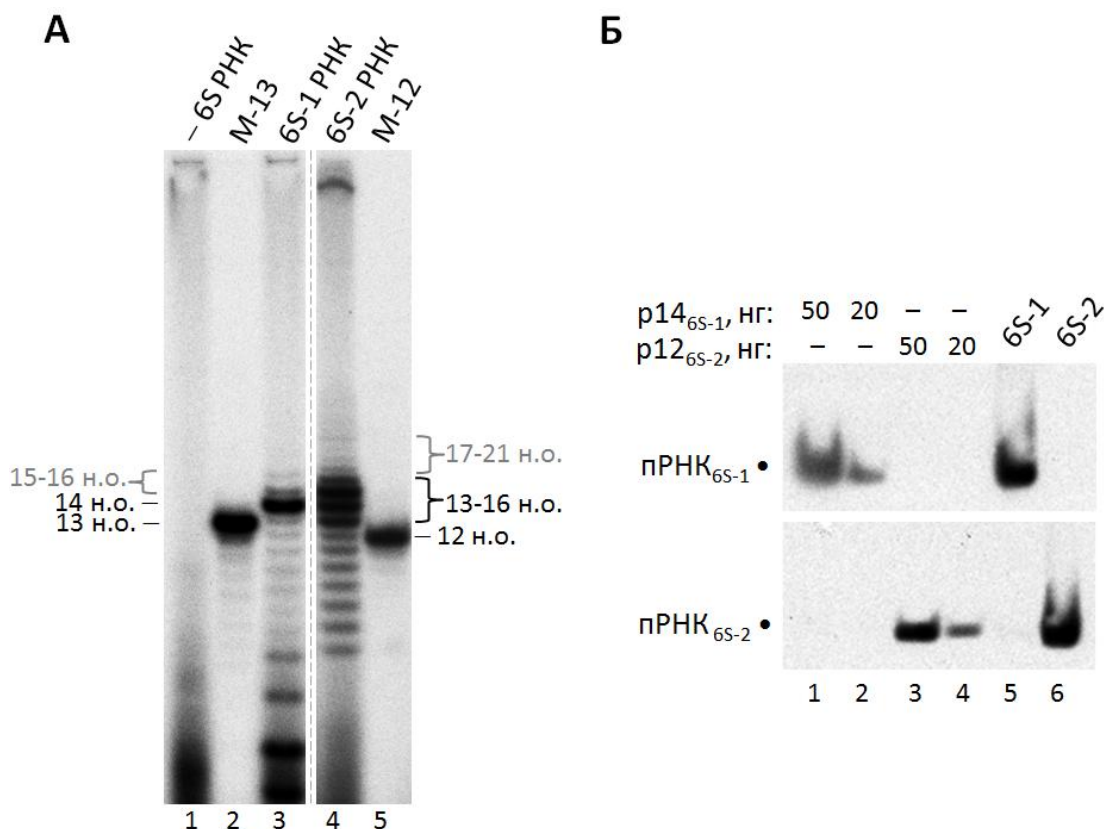


Рис. 3. Синтез пРНК *in vitro*. (А) Анализ продуктов транскрипции на матрице 6S-1 РНК (дорожка 3) и 6S-2 РНК (дорожка 4). Финальные концентрации (ф. к.): 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 200 мкМ 4×NTP; 0,5 мкКи [α - 32 P]УТР. Дорожки 2 и 5 – маркеры длины РНК, 5'-[32 P]-меченные олигорибонуклеотиды длиной 13 н.о. и 12 н.о. Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S РНК. Радиоавтограф 25%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины). (Б) Результаты блот-гибридизации продуктов транскрипции (ф.к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 200 мкМ 4×NTP) с матрицы 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* (дорожки 5 и 6, соответственно). Дорожки 1-2 и 3-4 – синтетические олигорибонуклеотиды (p14_{6S-1} и p12_{6S-2}), аналоги пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} длиной 14 н.о. и 12 н.о. (положительные контроли). Последовательности зондов к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}, соответственно: 5'-DIG-d(AGTTTTTGACCGAAC)-3' и 5'-DIG-d(GTTTTAACCTT)-3', где N – остаток LNA, DIG – остаток дигоксигенина.

В случае 6S-1 РНК наблюдали синтез ряда олигорибонуклеотидов длиной до 14-16 н.о., причем транскрипция 14-звенных вариантов пРНК_{6S-1} происходила с максимальной эффективностью (рис. 3А, дорожка 3). В случае 6S-2 РНК был зафиксирован синтез транскриптов длиной до 16 н.о. и более. Максимальный выход транскрипции наблюдали для 13-16-звенных продуктов (рис. 3А, дорожка 4). Для определения природы стартового нуклеотида в 6S-1 и 6S-2 РНК аналогичные эксперименты проводили в присутствии [γ -³²P]АТР и [γ -³²P]GTP, поскольку только первый из встраиваемых РНК-полимеразой NTP не гидролизуется с отщеплением пирофосфата с 5'-конца. Было установлено, что синтез пРНК на 6S-1 РНК начинается с остатка G, а синтез пРНК на 6S-2 РНК – с остатка А. Для определения нуклеотидных последовательностей пРНК транскрипцию проводили в присутствии различных [α -³²P]-меченных нуклеозидтрифосфатов, при этом длина первого из детектируемых транскриптов указывала на положение встраиваемого нуклеотида в цепи полноразмерной пРНК. Таким образом были выяснены позиции первых с 5'-конца остатков А, U, G и С в последовательностях пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. В обоих случаях только один комплементарный участок в каждой из 6S РНК соответствовал установленному расположению нуклеотидов относительно друг друга. Первичная структура пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} была также подтверждена методом блот-гибридизации в варианте Нозерн (рис. 3Б). В качестве зондов к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} использовали синтетические олигодезоксирибонуклеотиды заданной нуклеотидной последовательности с включениями остатков ковалентно замкнутых нуклеозидов (LNA, «locked nucleic acid»). В результате проведенных экспериментов было выяснено, что транскрипция обеих пРНК начинается внутри центральной петли и продолжается в сторону 5'-конца 6S-1 или 6S-2 РНК (схема 2), аналогично тому, как это было обнаружено для 6S РНК *E. coli* (Wassarman *et al.*, 2006). Нуклеотидные последовательности пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} содержат два идентичных участка 5'-GGU-3' и 5'-AAAACU-3', разделенных одним н.о.

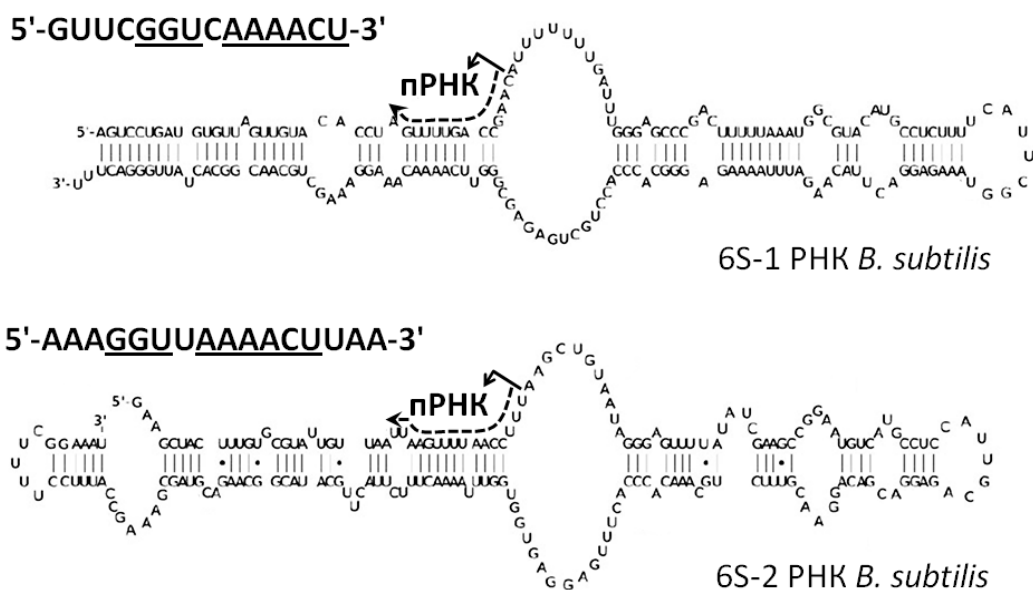


Схема 2.

Главным свойством пРНК является способность к образованию комплекса с 6S РНК и последующая потеря сродства такого комплекса к РНКП (схема 1). Возможность формирования комплексов 6S РНК:пРНК оценивали, анализируя взаимодействие 5'-[³²P]-меченных 6S РНК с РНКП в присутствии четырех NTP методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях. На рис. 4 приведен результат эксперимента с 6S-2 РНК. Аналогичные результаты были получены в случае 6S-1 РНК. Для предотвращения неспецифических взаимодействий 6S РНК и РНКП в реакционную смесь добавляли гепарин (40 нг/мкл). В отсутствие NTP детектировались только комплексы 6S РНК:РНКП и «свободные» 6S РНК (рис. 4, дорожка 1). При добавлении четырех NTP в концентрации 200 мкМ каждого наблюдали появление дополнительной радиоактивной зоны, характеризующейся меньшей подвижностью в геле по сравнению со «свободными» 6S РНК (рис. 4, дорожки 2-7). По скорости миграции комплекс, образующийся при синтезе пРНК на матрице 6S РНК соответствовал контрольному, «искусственно» полученному комплексу с 5'-[³²P]-меченным синтетическим олигорибонуклеотидом – аналогом пРНК (рис. 4, дорожка 9).

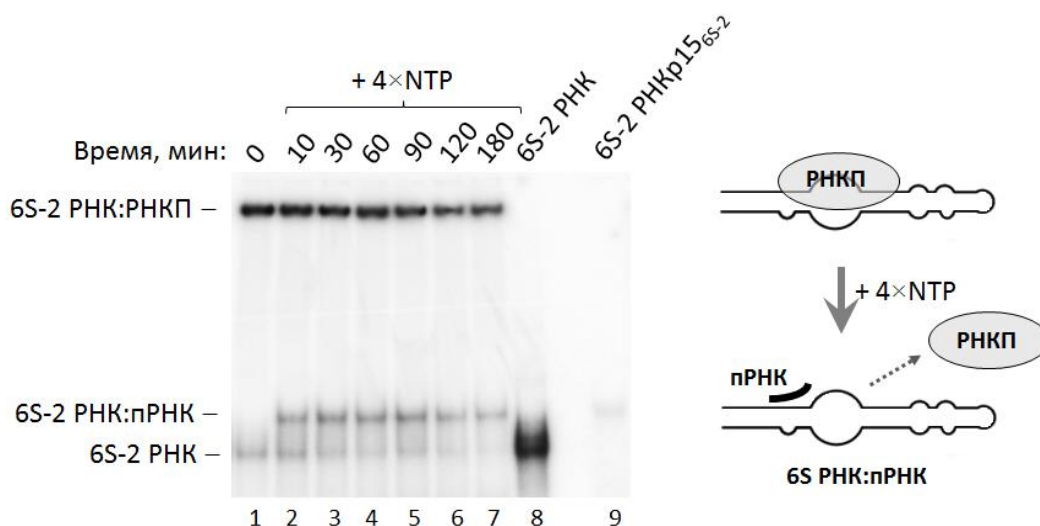


Рис. 4. Анализ комплексообразования 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК с холоферментом РНКП в присутствии 4×NTP (200 мкМ каждого). Дорожка 1 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-2 РНК (1 мкМ) в отсутствие NTP после инкубации при 37°C в течение 30 мин. Дорожки 2-7 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-2 РНК (1 мкМ) в присутствии 4×NTP после инкубации при 37°C в течение 10-180 мин. Дорожка 8 – исходная 6S-2 РНК. Дорожка 9 – комплекс 6S-2 РНК (1 мкМ) с 5'-[³²P]-меченным синтетическим аналогом пРНК_{6S-2} (1 мкМ) длиной 15 н.о. (p15_{6S-2}). Радиоавтограф 7,5%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Через 180 мин после начала транскрипции большая часть «свободной» 6S РНК оказывается в комплексе с пРНК (рис. 4, дорожка 7), в то же время степень связывания 6S РНК с РНКП несколько уменьшается (~80%) по сравнению с исходной степенью связывания до добавления 4×NTP (рис. 4, дорожка 1). Это свидетельствует о частичном высвобождении РНКП из комплекса с 6S-2 РНК после синтеза пРНК. Незначительная степень вытеснения РНКП из её комплекса с 6S РНК может быть связана с нестабильностью комплексов 6S РНК:пРНК из-за недостаточной длины

пРНК. Для проверки этой гипотезы было изучено комплексообразование РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 6S-1 или 6S-2 РНК и синтетическими олигорибонуклеотидами – аналогами пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. В случае 6S-1 РНК было показано, что образование дуплекса 6S-1 РНК:p14_{6S-1} практически полностью предотвращает связывание РНКП с 6S-1 РНК (рис. 5А). Выход комплекса 6S-1 РНК:РНКП в данном случае составляет меньше 3%. В то же время более короткие пРНК_{6S-1} (12 и 13 н.о.) не способны также эффективно препятствовать образованию комплекса 6S-1 РНК:РНКП. Вероятно, это связано с тем, что даже при 10-кратном избытке этих олигорибонуклеотидов не удалось добиться их 100%-ного связывания с 6S-1 РНК с образованием дуплексов. По-видимому, в данном случае при добавлении РНКП фермент связывал свободную 6S-1 РНК. Синтетическая 20-звенная пРНК_{6S-1} полностью исключала возможность взаимодействия РНКП с 6S-1 РНК.

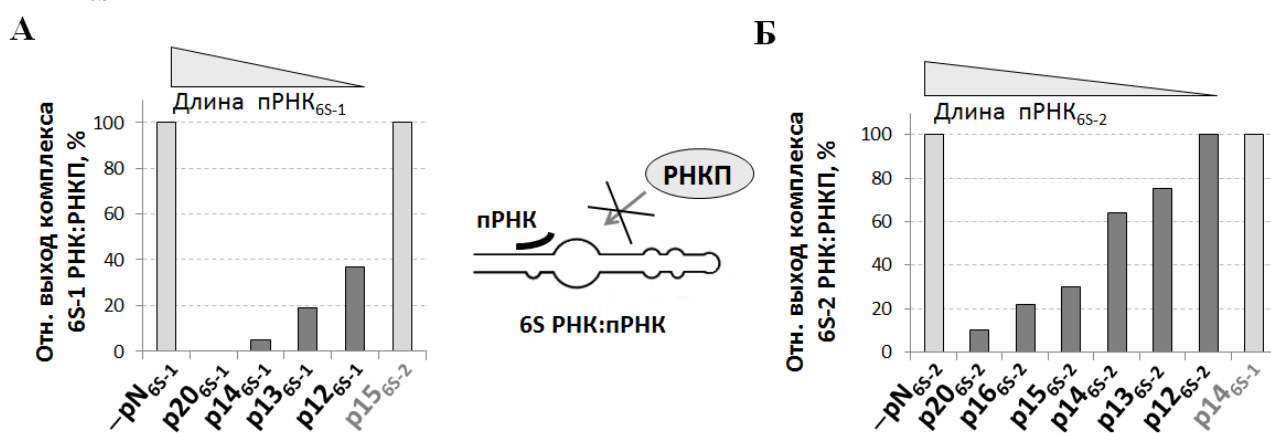


Рис. 5. Анализ взаимодействия холофермента РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 6S-1 РНК или 6S-2 РНК и синтетическими пРНК различной длины. Диаграммы относительного выхода комплексов 6S-1 РНК:РНКП (А) и 6S-2 РНК:РНКП (Б) (за 100% принимали выход комплекса в отсутствие пРНК). Серым цветом отмечены некомплементарные для 6S РНК олигорибонуклеотиды.

Несмотря на 100%-ную эффективность связывания 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК с 15-звенной и 16-звенной пРНК_{6S-2} (p15_{6S-2} и p16_{6S-2}), РНКП способна образовывать комплекс с 6S-2 РНК с эффективностью до ~30% (рис. 5Б). Такой результат можно было бы объяснить способностью РНКП связывать дуплекс 6S-2 РНК:p15_{6S-2} или дуплекс 6S-2 РНК:p16_{6S-2}. Однако в контрольных экспериментах при использовании 5'-[³²P]-меченной 15-звенной пРНК_{6S-2} «тройной» комплекс РНКП:6S-2 РНК:p15_{6S-2} не детектировался. Это означает, что РНКП связывала 6S-2 РНК после её диссоциации из комплекса 6S-2 РНК:пРНК. 20-Звенный олигорибонуклеотид – аналог пРНК_{6S-2} – практически полностью предотвращал взаимодействие фермента с 6S-2 РНК (рис. 5Б).

Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что основные продукты транскрипции *in vitro* с матрицы 6S-2 РНК (13-16 н.о.) являются нефункциональными, т.к. при взаимодействии с 6S-2 РНК не могут предотвратить её связывание с РНКП. Однако, это возможно в случае синтеза 20-звенной пРНК_{6S-2}, по своим свойствам аналогичной 14-звенной пРНК_{6S-1}. Следует ожидать, что более длинные варианты

пРНК_{6S-2} образуют еще более стабильные комплексы с 6S-2 и тоже препятствуют взаимодействию молекулы с РНКП. Тем не менее, в экспериментах *in vitro* выход пРНК_{6S-2} длиной больше 16 н.о. составляет менее ~3% от общего количества пРНК_{6S-2} разной длины (рис. 3А). Мы предположили, что в определенных условиях (возможно, имеющих место *in vivo*) транскрипция пРНК_{6S-2} может «сдвигаться» в сторону более длинных транскриптов. В первую очередь это может происходить при изменении концентрации нуклеозидтрифосфатов, главным образом АТР и ГТР. Известно, что изменение их концентраций при переходе клеток *B. subtilis* из экспоненциальной в стационарную фазу роста (понижение уровня ГТР и возрастание АТР) вызывает существенные изменения в транскриптоме за счет активации транскрипции с альтернативных промоторов (Krasny *et al.*, 2008). Для изучения зависимости выхода пРНК от концентрации АТР или ГТР ($C_{\text{АТР}}$ или $C_{\text{ГТР}}$) эксперименты по транскрипции *in vitro* с матрицы 6S-1 или 6S-2 РНК проводили, варьируя концентрацию этих нуклеозидтрифосфатов от 10 мкМ до 2 мМ в присутствии остальных трех НТР (200 мкМ каждого). Эффективность синтеза пРНК_{6S-1} практически не зависела от концентрации как ГТР, так и АТР, хотя при $C_{\text{АТР}} = 1-2$ мМ увеличивался выход 15- и 16-звенных пРНК_{6S-1}. Другая ситуация наблюдалась в случае 6S-2 РНК. Несмотря на то, что пРНК_{6S-2} содержат только два остатка G (в положениях 4 и 5), эффективность их синтеза возрастает при увеличении $C_{\text{ГТР}}$ и достигает максимума при 500 мкМ. При этом соотношение продуктов транскрипции разной длины не изменяется. Наиболее значимым результатом является обнаружение зависимости эффективности синтеза пРНК_{6S-2} от концентрации АТР. При $C_{\text{АТР}} = 10-20$ мкМ транскрипция с матрицы 6S-2 РНК невозможна и лишь в присутствии 200-500 мкМ АТР выход транскрипции 13-16-звенных пРНК_{6S-2} становится сравнимым с выходом пРНК_{6S-1} с матрицы 6S-1 РНК. Дальнейшее увеличение концентрации АТР (1-2 мМ) приводит к заметному увеличению эффективности синтеза протяженных транскриптов длиной 17-18 и 23-26 н.о. (рис. 6). Отметим, что транскрипция с матрицы 6S-2 РНК начинается с трех подряд остатков А, а полноразмерные пРНК_{6S-2} (13-26 н.о.) содержат в среднем 55% остатков А от общего числа нуклеотидов (схема 2).

Таким образом, в ходе изучения свойств 6S-1 и 6S 2 РНК *B. subtilis* в условиях *in vitro* впервые удалось установить факт синтеза пРНК на обеих 6S РНК и определить нуклеотидные последовательности пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. Продемонстрирована способность синтезированных пРНК образовывать дуплексы с соответствующей 6S РНК и вытеснять РНКП из её комплекса с 6S РНК. Обнаружено важное отличие в функционировании 6S-1 и 6S-2 РНК. Преобладающий продукт транскрипции с матрицы 6S-1 РНК – 14-звенная пРНК_{6S-1} – образует стабильный комплекс с 6S-1 РНК и блокирует доступ к ней РНК-полимеразы. Длина преобладающих при транскрипции пРНК_{6S-2} (13-16 н.о.) недостаточна для эффективного комплексообразования с 6S-2 РНК, а синтез более протяженных продуктов транскрипции, формирующих прочный дуплекс с 6S-2 РНК, незначителен и, вероятно, требует особых условий. Одним из

таких условий может являться высокая концентрация АТР, стимулирующая синтез пРНК_{6S-2} длиной 23-26 н.о. Тем не менее, обе 6S РНК со сравнимой эффективностью ингибируют транскрипционную активность РНКП.

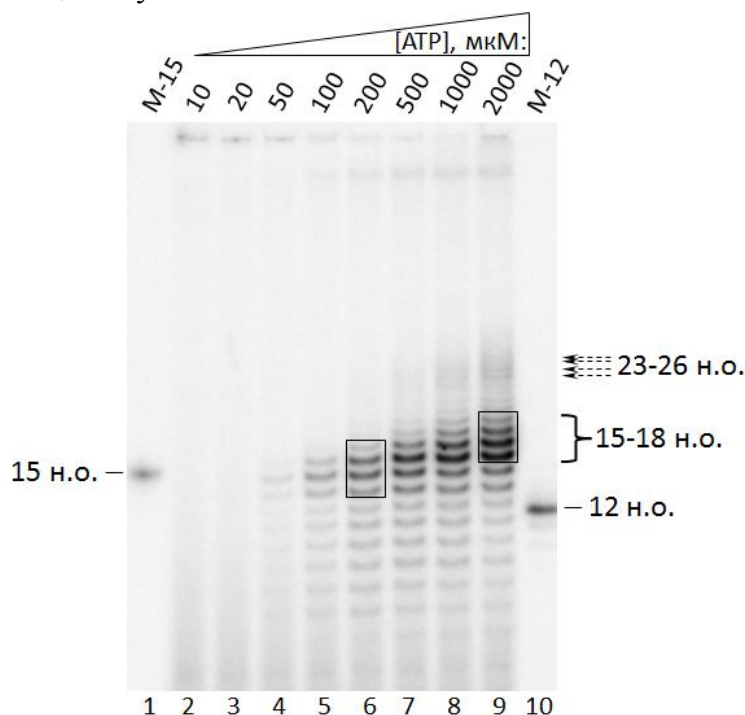


Рис. 6. Зависимость синтеза пРНК на матрице 6S-2 РНК от концентрации АТР. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S-2 РНК; 100 нг/мкл гепарина; 200 мкМ каждого из СТР, GТР, УТР; 0,5 мкКи [α -³²P]УТР. Дорожки 1 и 10 – маркеры длины РНК (М-15 и М-12), 5'-[³²P]-меченные олигорибонуклеотиды р15_{6S-2} и р12_{6S-2}. Дорожки 2-10 – транскрипция пРНК_{6S-2} при возрастающей концентрации АТР (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 мкМ, соответственно). Радиоавтограф 25%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

3. Исследование роли 6S-1 и 6S-2 РНК *in vivo*

На сегодняшний день существует крайне мало данных о физиологической роли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis in vivo*. Показано, что делеции генов *bsrA* и *bsrB* не приводят к существенным изменениям роста и жизнеспособности клеток *B. subtilis* (Suzuma et al., 2002; Cavanagh et al., 2011). Для выяснения биологической роли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* нужно было установить, влияет ли их отсутствие на экспрессию клеточных белков. Кроме того, необходимо было подтвердить факт синтеза РНК-полимеразой пРНК с матриц 6S-1 и 6S-2 РНК в условиях *in vivo*.

Для проведения исследований использовали клеточные линии *B. subtilis* PY79 с делециями генов *bsrA* и/или *bsrB*. Из клеток с двойным нокаутом (Δ *bsrAB*) были получены штаммы с измененной локализацией генов *bsrA* или *bsrB*: Δ *bsrAB*+*A* и Δ *bsrAB*+*B*³. Таким образом штаммы Δ *bsrAB*+*A* и Δ *bsrAB*+*B* содержали «комплемент» гена *bsrA* или *bsrB*. Нами показано, что проведенные манипуляции с геномом

³ Инсерции соответствующих фрагментов ДНК проводили в локус *amyE*, кодирующий α -амилазу и не являющийся необходимым для жизнедеятельности *B. subtilis*.

B. subtilis практически не влияют на жизнеспособность и скорость роста клеток. Различия значений оптической плотности клеточных культур в течение 48 ч выращивания являются сравнимыми в пределах погрешности измерения. Только клетки с двойным нокаутом генов *bsrA* и *bsrB* замедляют скорость роста на стадии перехода из экспоненциальной в стационарную фазу.

3.1. Идентификация пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} *B. subtilis in vivo*

На первом этапе были проанализированы уровни экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК на различных стадиях клеточного роста *B. subtilis* PY79 (дикий тип). Для этого клетки культивировали в богатой питательной среде в течение 48 ч, отбирая аликвоты для выделения общей РНК через 3, 4,5, 6, 10, 24, 36 и 48 ч после инокуляции (рис. 7А). Затем проводили блот-гибридизацию общей РНК, выделенной из клеток в различные промежутки времени, с зондами к 6S-1 и 6S-2 РНК, а также с зондом к 5S РНК в качестве РНК сравнения.

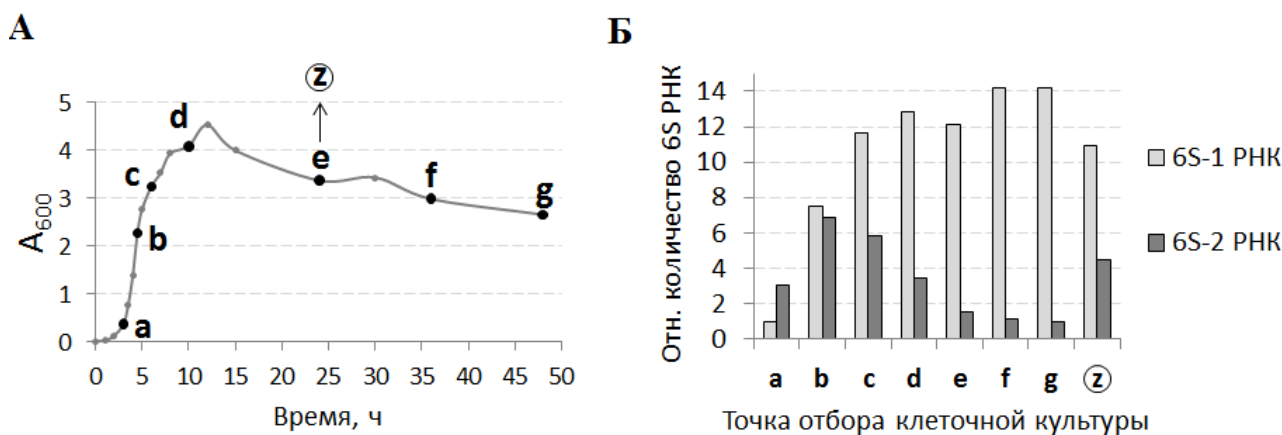


Рис. 7. Анализ уровня экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК в клетках *B. subtilis* PY79. (А) Кривая клеточного роста *B. subtilis* PY79. Черными точками и буквами (a-g) отмечено время отбора аликвот клеточной культуры для выделения общей РНК: 3, 4,5, 6, 10, 24, 36 и 48 ч, соответственно. Буквой z в круге отмечена аликвота клеточной культуры, использовавшаяся для моделирования стадии выхода из стационарной фазы роста клеток⁴. (Б) Диаграмма уровней экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* PY79 (на основе данных блот-гибридизации общей РНК (3 мкг) с зондами к 6S-1 и 6S-2 РНК), нормированных по количеству 5S РНК. За единицу принимали минимальную концентрацию 6S РНК (в точке a для 6S-1 РНК и в точке g для 6S-2 РНК).

Синтез 6S-1 РНК аккумулируется в поздней экспоненциальной – ранней стационарной фазах роста клеток⁵. Максимальная концентрация 6S-2 РНК, наоборот, наблюдается в средней экспоненциальной фазе роста клеток, затем снижается в ~4-6 раз при переходе в позднюю стационарную фазу, а при увеличении содержания питательных веществ в культуральной среде и выходе клеток из

⁴ Аликвоту клеточной культуры, отобранную после 24 ч выращивания, разбавляли в соотношении 1:5 свежей питательной средой и инкубировали в течение 5 мин, а затем проводили выделение общей РНК (точка z).

⁵ После 24 ч культивации клеток зафиксирована сильная деградация 6S-1 РНК (до 50%), затрудняющая оценку суммарного количества этой РНК.

стационарной фазы вновь повышается (рис. 7Б). Те же самые образцы общей РНК были проанализированы методом блот-гибридизации с зондами к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. В случае 6S-1 РНК удалось детектировать слабые сигналы пРНК на протяжении практически всей стационарной фазы роста клеток, а максимальная концентрация пРНК_{6S-1} была зафиксирована на стадии выхода из стационарной фазы (рис. 8А).

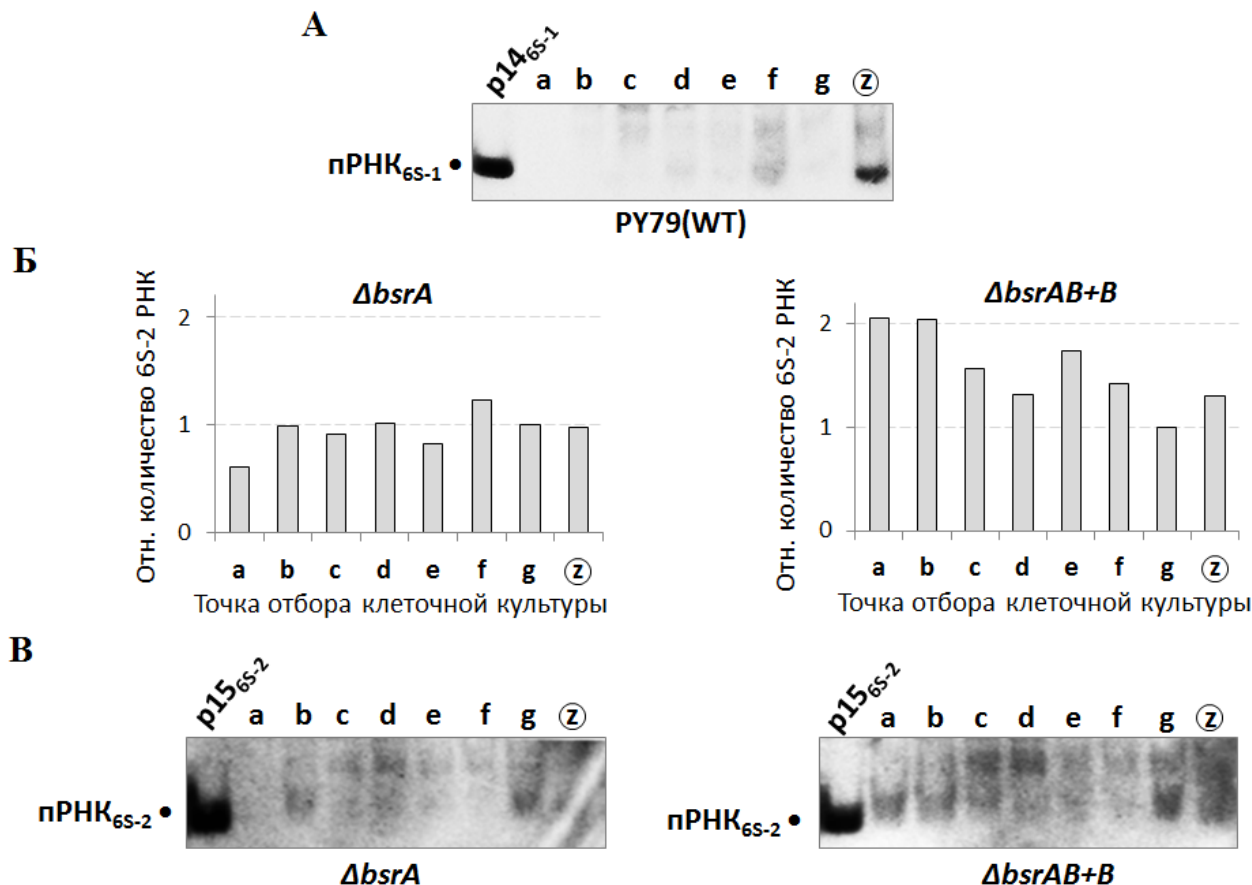


Рис. 8. Анализ наличия пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} в клетках *B. subtilis*. (А) Результаты блот-гибридизации общей РНК (10 мкг), выделенной на различных стадиях роста *B. subtilis* PY79, с зондом к пРНК_{6S-1}. В качестве положительного контроля использовали синтетическую пРНК_{6S-1} длиной 14 н.о. (p14_{6S-1}, 0,5 нг). (Б) Диаграммы уровней экспрессии 6S-2 РНК в клетках $\Delta bsrA$ и $\Delta bsrAB+B$ (нормированы по концентрации 5S РНК) в промежутки времени, соответствующие точкам отбора клеточной культуры (см. рис. 7). За единицу принимали концентрацию 6S-2 РНК в точке g. (В) Результаты блот-гибридизации общей РНК (10 мкг), выделенной на различных стадиях роста клеток $\Delta bsrA$, $\Delta bsrAB+B$ с зондом против пРНК_{6S-2}. В качестве положительного контроля использовали синтетическую пРНК_{6S-2} длиной 15 н.о. (p15_{6S-2}, 0,5 нг).

В случае 6S-2 РНК статистически значимых сигналов детектировать не удалось. Мы предположили, что более эффективный синтез пРНК_{6S-2} может происходить в мутантных клеточных линиях $\Delta bsrA$ и $\Delta bsrAB+B$, поскольку в отсутствие 6S-1 РНК концентрация 6S-2 РНК оставалась высокой на протяжении всего времени культивирования клеток (рис. 8Б). Результаты блот-гибридизации общей РНК, выделенной из клеточных линий $\Delta bsrA$ и $\Delta bsrAB+B$, с зондом к пРНК_{6S-2} приведены на рис. 8В. Сигналы, обнаруженные в клеточной линии $\Delta bsrAB+B$ с «комплементом» гена *bsrB*, достаточно интенсивны, и могут рассматриваться как экспериментальное

свидетельство транскрипции пРНК с матрицы 6S-2 РНК *in vivo*. Однако длина детектируемых пРНК была несколько больше ожидаемой. Можно предположить, что они соответствуют протяженным пРНК_{6S-2} длиной 23-26 н.о. В клетках дикого типа аналогичные сигналы не были обнаружены, поэтому вопрос об условиях, в которых синтез пРНК_{6S-2} происходит *in vivo*, остается открытым.

3.2. Влияние 6S-1 и 6S-2 РНК на экспрессию белков *B. subtilis*

Для установления роли 6S-1 и 6S-2 РНК в экспрессии белков *B. subtilis* был проведен сравнительный протеомный анализ клеточных линий, содержащих делеции генов *bsrA* и/или *bsrB* с клетками дикого типа. Отбор аликвот клеточных культур для выделения общего белка проводили после достижения значений оптической плотности $A_{600} \sim 1$ О.Е. (после ~ 3 ч от начала культивирования, средняя экспоненциальная фаза роста) и $A_{600} \sim 4$ О.Е. (после ~ 8 ч от начала культивирования, ранняя стационарная фаза роста) (рис. 7). В белки из сравниваемых клеточных линий вводили лизин-специфичные флуоресцентные красители – гидроксисукцинимидные эфиры Cy3 ($\lambda_{исп} = 570$ нм, зеленый) и Cy5 ($\lambda_{исп} = 670$ нм, красный). Окрашенные образцы белков смешивали в эквимольном соотношении и полученную смесь анализировали методом двумерного гель-электрофореза. В первом направлении белки разделяли методом изоэлектрического фокусирования. Во втором направлении проводили электрофорез в денатурирующих условиях, разделяя белки по молекулярным массам. На изображении геля белкам, содержащимся в сравниваемых образцах в равных количествах, соответствуют зоны желтого цвета за счет наложения флуоресценции Cy3 (зеленый цвет) и Cy5 (красный цвет). Соответственно, белки, преобладающие в одном из образцов, визуализируются в виде зон красного или зеленого цвета.

Максимальные изменения протеома при делеции гена *bsrB* были зафиксированы в экспоненциальной фазе роста клеток – появлялось большое количество красных зон на геле, соответствующих белкам, экспрессия которых должна ингибироваться посредством 6S-2 РНК (рис. 9). Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF было идентифицировано 11 таких белков: AcoB, AhpC, GapA, KatA, Mdh, MntA, RplJ, PyrG, SufC, TriA и YvyD (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, экспрессия которых регулируется только 6S-2 РНК.

Белок	Предполагаемая функция
AcoB – ацетоиндегидрогеназа	Превращение ацетоина в диметилглиоксаль
GapA – глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа	Окисление D-глицеральдегид-3-фосфата (гликолиз)
PyrG – СТР-синтетаза	Синтез СТР

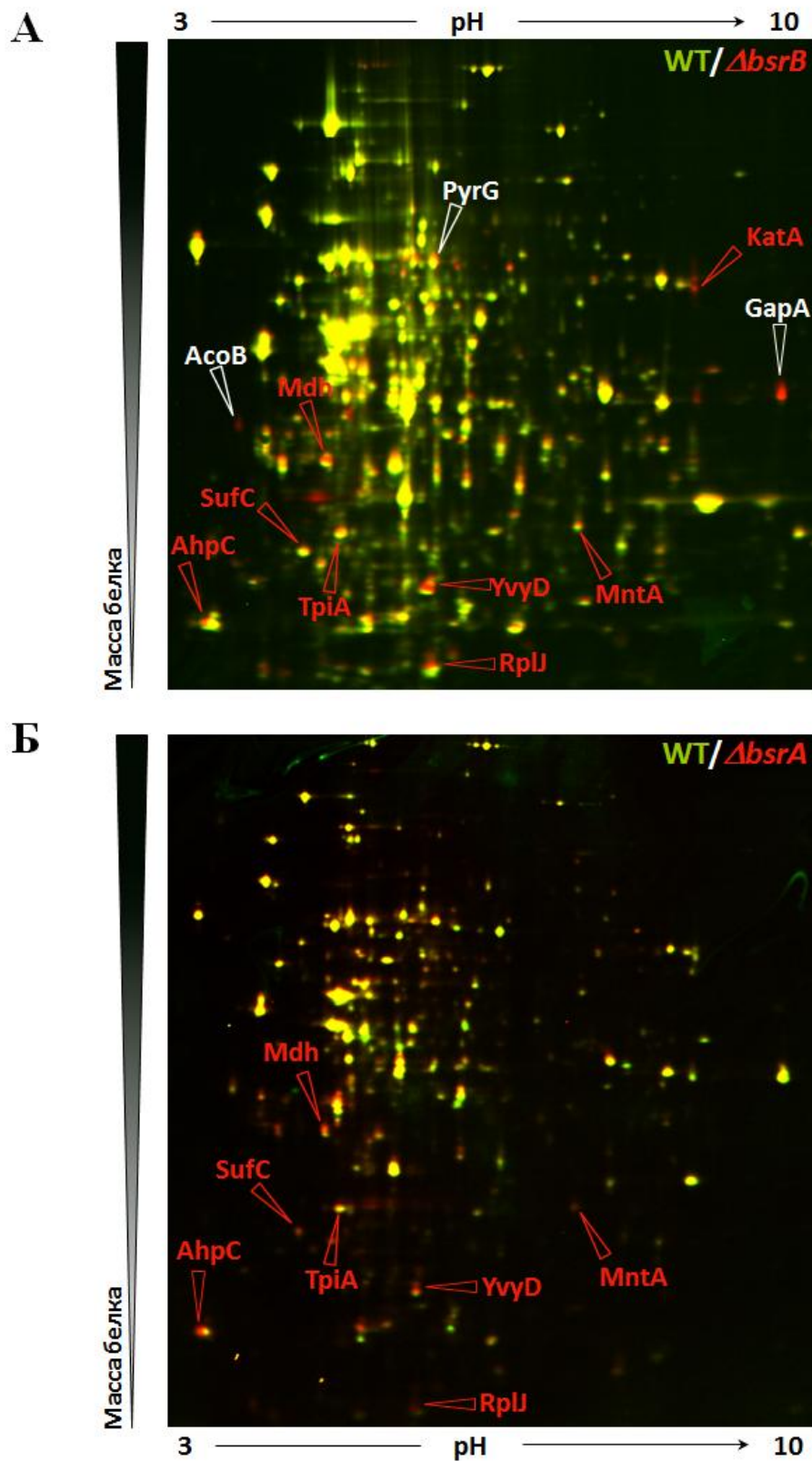


Рис. 9. Сравнительный протеомный анализ белковых фракций, выделенных из клеточных линий *B. subtilis* дикого типа (PY79) и мутантного штамма $\Delta bsrB$ в экспоненциальной фазе роста клеток (А) или мутантного штамма $\Delta bsrA$ в стационарной фазе роста клеток (Б). Зоны красного и зеленого цвета на двумерном геле соответствуют белкам, уровень экспрессии которых, соответственно, увеличивается или уменьшается, при делеции гена *bsrA*. Идентифицированные с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF белки подписаны. Красным шрифтом выделены названия белков, экспрессия которых ингибируется обеими 6S РНК, белым – только 6S-2 РНК.

Таблица 2. Белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, экспрессия которых регулируется как 6S-1, так и 6S-2 РНК.

Белок	Предполагаемая функция
AhpC – алкилгидропероксидредуктаза (малая субъединица)	Восстановление H ₂ O ₂ в условиях окислительного стресса клетки
KatA – вегетативная каталаза	Разложение H ₂ O ₂ в условиях окислительного стресса клетки
Mdh – малатдегидрогеназа	Окисление малата в оксалоацетат (цикл Кребса)
MntA – Mn ²⁺ -связывающий липопротеин, ABC-транспортер	Транспорт Mn ²⁺ через клеточную мембрану
RplJ – белок L10 50S-субчастицы рибосомы	Участие в клеточном ответе на холодовой шок и высокую концентрацию соли, структурная функция
SufC – АТРаза в составе клеточного аппарата мобилизации серы	Гидролиз АТР, мобилизация железа и серы в условиях окислительного стресса клетки
TriA – триозофосфатизомераза	Превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в дигидроксиацетонфосфат (гликолиз)
YvyD – ассоциированный с рибосомой белок модуляции транскрипционного фактора σ^L	Ингибирование синтеза σ^L в условиях аминокислотного голодания

В тех же условиях при делеции гена *bsrA* существенных изменений зафиксировано не было. Такой результат был ожидаем, поскольку концентрация 6S-1 РНК в экспоненциальной фазе роста клеток низка. Тем не менее, в отсутствие 6S-1 РНК в значительной степени увеличивалась экспрессия как минимум 3 белков: AhpC, RplJ и KatA. Уровень экспрессии этих белков повышался и в отсутствие 6S-2 РНК (рис. 9А).

Более заметные изменения в протеоме клеток *ΔbsrA* были зафиксированы в стационарной фазе роста, однако наблюдаемый эффект был слабее предполагаемого (рис. 9Б). Частично это может быть связано с глобальным уменьшением синтеза белков при переходе в стационарную фазу роста клеток и, как следствие, с меньшей интенсивностью сигналов флуоресценции. Несмотря на то, что концентрация 6S-2 РНК в стационарной фазе роста клеток относительно низка, делеция гена *bsrB* в данном случае по-прежнему вызывала заметные изменения в клеточном протеоме. Экспрессия некоторых белков в стационарной фазе увеличивалась как в отсутствие 6S-1 РНК, так и в отсутствие 6S-2 РНК. Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF были идентифицированы два таких белка – Mdh и YvyD. Некоторые белки эффективнее экспрессировались в отсутствие только 6S-1 РНК (AhpC, SufC, TriA, MntA) или только 6S-2 РНК (KatA, GapA). В ходе протеомного анализа клеток *ΔbsrAB* по сравнению с клетками дикого типа наблюдали «суммарный» эффект делеций *bsrA* и *bsrB*, обусловленный одновременным возрастанием экспрессии белков, зависящей от присутствия как 6S-1, так и 6S-2 РНК.

Таким образом, в результате сравнения общих протеомов штаммов *ΔbsrA* и *ΔbsrB* и клеток дикого типа было установлено, что обе 6S РНК влияют на экспрессию генов в *B. subtilis*. Больше количество белков с измененным уровнем экспрессии было зафиксировано в случае делеции гена *bsrB*, кодирующего 6S-2 РНК. Ингибирующее влияние 6S-1 РНК на биосинтез белков оказалось менее заметным. Анализируя функции идентифицированных белков (табл. 1 и 2), можно сказать, что большинство из них участвуют в процессах метаболизма и адаптации клетки к стрессовым условиям, то есть отсутствуют в клетке в «спокойном» состоянии. Таким образом, нами впервые была установлена физиологическая роль 6S-1 РНК и 6S-2 РНК как регуляторов экспрессии белков.

ВЫВОДЫ

1. Впервые продемонстрирована способность 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* ингибировать *in vitro* транскрипцию с модельных промоторов генов *rrnB*, *rrnO*, *veg*, *tuf*, *argC*, *appD* и *cspB* *B. subtilis* и C2 фага $\phi 29$. Установлено, что обе 6S РНК проявляют сравнимую эффективность ингибирования транскрипции вне зависимости от нуклеотидных последовательностей промоторных элементов выбранных генов и природы стартового нуклеотида.

2. Разработана методика выделения холофермента РНК-полимеразы (РНКП) *B. subtilis*, показано его специфическое взаимодействие как с 6S-1, так и с 6S-2 РНК *B. subtilis*. Константы диссоциации комплексов 6S-1 РНК:РНКП и 6S-2 РНК:РНКП имеют сопоставимые значения.

3. Впервые продемонстрирован *in vitro* синтез коротких фрагментов РНК (пРНК) на 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* в качестве матриц для транскрипции и определены их нуклеотидные последовательности. Длина преобладающих пРНК-транскриптов составляет 14 н.о. для пРНК_{6S-1} и 13-16 н.о. для пРНК_{6S-2}. В случае 6S-2 РНК возможен синтез длинных транскриптов до 26 н.о., эффективность которого прямо пропорциональна концентрации аденозинтрифосфата.

4. Установлено, что и пРНК_{6S-1}, и пРНК_{6S-2} формируют РНК-РНК дуплексы с 6S-1 и 6S-2 РНК, соответственно. Показано, что 14-звенная пРНК_{6S-1} образует стабильный комплекс с 6S-1 РНК и блокирует доступ к ней РНК-полимеразы. В случае 6S-2 РНК сравнимая стабильность комплекса с пРНК_{6S-2} наблюдается только для 20-звенных транскриптов.

5. Впервые показано, что делеции генов *bsrA* и *bsrB*, кодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК, влияют на экспрессию белков в клетках *B. subtilis*. Установлено, что ингибирование экспрессии белков AhpC, KatA, Mdh, MntA, RplJ, SufC, TriA и YvyD может быть вызвано влиянием как 6S-1, так и 6S-2 РНК. Снижение уровня экспрессии белков AcoB, GapA и PyrG связано с присутствием в клетке 6S-2 РНК. Все идентифицированные белки участвуют в процессах метаболизма, в частности, в условиях окислительного стресса, аминокислотного голодания и холодового шока.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Beckmann B.M., Burenina O.Y., Hoch P.G., Kubareva E.A., Sharma C.M., Hartmann R.K. *In vivo* and *in vitro* analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*. // *RNA Biology*. 2011. V. 8. N 5. P. 839-849.
2. Буренина О.Ю., Федотова Е.А., Рязанова А.Ю., Проценко А.С., Захарова М.В., Карягина А.С., Солонин А.С., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. Особенности регуляции экспрессии генов в системе рестрикции–модификации Ecl18kI. // *Acta naturae*. 2013. Т. 5. № 2 (17). С. 72-82.
3. Burenina O.Y., Hoch P.G., Damm K., Salas M., Zatsepin T.S., Lachner M, Oretskaya T.S., Kubareva E.A., Hartmann R.K. Mechanistic comparison of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs – commonalities and differences. // *RNA*. 2014. V. 20. N 3. P. 348-359.
4. Burenina O.Y., Beckmann B.M., Kubareva E.A., Hartmann R.K. Investigation of transcription regulation by 6S RNAs from *Bacillus subtilis*. Abstract book of the Workshop «Enzymes and enzyme complexes acting on nucleic acids» of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow, 16.05.10-19.05.10, Vilnius (Lithuania). P. 43.
5. Burenina O.Y., Beckmann B.M., Kubareva E.A., Hartmann R.K. Investigation of 6S-2 RNA of *Bacillus subtilis*. Abstract book of the One-site evaluation conference «Enzymes and multienzyme complexes acting on nucleic acids» of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow, 21.09.10-22.09.10, Giessen (Germany). P. 58.
6. Burenina O.Y., Beckmann B.M., Kubareva E.A., Hartmann R.K. Investigation of 6S-2 RNA of *Bacillus subtilis*. Abstract book of the Third Conference of International Graduate School for the Life Sciences, 29.09.10-30.09.10, Giessen (Germany). P.125.
7. Kubareva E.A., Burenina O.Y., Hoch P.G., Beckmann B.M., Hartmann R.K. Peculiarities of 6S RNAs from *Bacillus subtilis* functioning. Abstract book of the Sixth Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 04.09.11-07.09.11, Cambridge (UK). P. 47.
8. Hartmann R.K., Burenina O.Y., Hoch P.G., Beckmann B.M., Kubareva E.A. Dissecting the differential roles of the two 6S RNAs from *Bacillus subtilis*. Abstract book of the Progress Report Meeting “Sensory and regulatory RNAs in prokaryotes”, 26.09.11-28.09.11, Reinhardswaldschule Kassel (Germany). P. 23.
9. Елкина Д.А., Буренина О.Ю. Сравнение функциональной роли 6S-1 и 6S-2 РНК *Bacillus subtilis*. Материалы международной конференции молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2013». Секция «Химия». Подсекция «Химия живых систем и нанобиотехнологии». С. 18.

10. Elkina D., Burenina O. Proteomics as a possible way to elucidate physiological roles of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs *in vivo*. Abstract book of the Offspring-Meeting of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow, 26.06.13-29.06.13, Moscow (Russia). P. 46.
11. Burenina O.Y., Hoch P.G., Kubareva E.A., Hartmann R.K. Interaction of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs with RNA polymerase – comparative functional analyses and proteomics of 6S-1/2 knockout strains. Abstracts of the 38th FEBS Congress, 06.07.13-11.07.13, Saint Petersburg (Russia). FEBS Journal. V. 280 (Suppl. 1). P. 37.
12. Burenina O., Hoch P., Nesterchuk M., Kubareva E., Dontsova O., Hartmann R. Comparative functional analyses of 6S-1 and 6S-2 RNAs from *Bacillus subtilis*. Abstract book of the Workshop “Global and mechanistic approaches in nucleic acid biology” of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow, 17.09.13-20.09.13, Saint Petersburg (Russia). P. 31.