

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

БУРЕНИНА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА

**МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ 6S-1 И 6S-2 РНК ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*:
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

02.00.10 – биоорганическая химия

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Кубарева Е.А.

МОСКВА – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. Механизмы регуляции транскрипции посредством некодирующих РНК в прокариотах и эукариотах (<i>Обзор литературы</i>)	8
I.1. Природа и разнообразие некодирующих РНК	8
I.2. 6S РНК - бактериальная некодирующая РНК, регулирующая транскрипцию	12
I.2.1. История открытия и первых исследований 6S РНК	12
I.2.2. 6S РНК <i>Escherichia coli</i>	15
I.2.2.1. Функция 6S РНК	15
I.2.2.2. Генетическая организация гена <i>ssrS</i> , процессинг 6S РНК.....	17
I.2.2.3. Механизм функционирования 6S РНК как регулятора транскрипции	21
I.2.3. Характеристика 6S РНК из различных бактерий	30
I.2.3.1. Две 6S РНК <i>Legionella pneumophila</i>	32
I.2.3.2. Две 6S РНК <i>Bacillus subtilis</i>	33
I.3. Некодирующие РНК, регулирующие активность РНКП II в клетках эукариот	37
I.3.1. FC РНК – аптамер, связывающий РНКП II	37
I.3.2. Регуляторные РНК, кодируемые SINE-элементами	40
I.3.2.1. Alu РНК человека и B1 РНК мыши	41
I.3.2.2. B2 РНК мыши	44
I.3.3. Некоторые некодирующие РНК, регулирующие транскрипцию при взаимодействии с транскрипционными факторами	51
I.3.3.1. 7SK и TAR РНК	51
I.3.3.2. SRA РНК.....	57
I.3.3.3. U1 мяРНК	60
I.3.3.4. DHFR нкРНК.....	61
I.3.3.5. GAS5 РНК	62
ГЛАВА II. Малые некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК из <i>Bacillus subtilis</i> : сравнительный анализ свойств и функций (<i>Обсуждение результатов</i>)	65
II.1. Выделение 6S-1 и 6S-2 РНК <i>Bacillus subtilis</i>	66
II. 2. Выделение РНК-полимеразы <i>Bacillus subtilis</i>	68

II.3. Изучение комплексообразования 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП.....	72
II.4. Изучение конкуренции между 6S-1/6S-2 РНК и промоторами ДНК в условиях транскрипции <i>in vitro</i>	74
II.5. Особенности взаимодействия РНКП с 6S-1 и 6S-2 РНК: синтез пРНК	84
II.6. Исследование роли 6S-1 и 6S-2 РНК <i>B. subtilis in vivo</i>	104
II.6.1. Характеристика клеточных линий <i>B. subtilis</i> , используемых для выяснения роли 6S-1 и 6S-2 РНК <i>in vivo</i>	105
II.6.2. Синтезируются ли пРНК <i>in vivo</i> ?.....	107
II.6.3. Влияние делеций генов <i>bsrA</i> и <i>bsrB</i> на экспрессию белков <i>B. subtilis</i>	112
ГЛАВА III. Экспериментальная часть.....	119
III.1. Реактивы и материалы.....	119
III.2. Приборы и методы.....	123
III.3. Общие методики	127
ВЫВОДЫ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	146

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к.	аминокислота
а.о.	аминокислотный остаток
БСА	бычий сывороточный альбумин
БФС	бромфеноловый синий
кДа	килодальтон
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	1,4-дитиотреит (<i>трео</i> -2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан)
ИПТГ	изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид
Ки	Кюри, единица измерения активности вещества
КЦ	ксиленцианол
мРНК	матричная РНК
миРНК	малая интерферирующая РНК
мяРНК	малая ядерная РНК
мяРНП	малый ядерный рибонуклеопротеид
мякРНК	малая ядрышковая РНК
НК	нуклеиновая кислота
нкРНК	некодирующая РНК
н.о.	нуклеотидный остаток
н.п.	нуклеотидная пара
ПААГ	полиакриламидный гель
ПИК	преинициаторный комплекс
пРНК	pRNA, «product» RNA, продукты транскрипции с 6S РНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНКП	РНК-полимераза
рРНК	рибосомная РНК
РСА	рентгеноструктурный анализ
Трис	<i>трис</i> -(гидроксиметил)аминометан
тРНК	транспортная РНК
УФ	ультрафиолетовое излучение
Ф. к.	финальная концентрация
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

4×NTP	смесь четырех нуклеозидтрифосфатов (АТФ, СТР, ГТР, УТР) в эквимольном соотношении
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Ala	аланин, аминокислота
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CTD	С-концевой домен
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Glu	глутаминовая аминокислота
GTF	general transcription factors, факторы транскрипции
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HEPES	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоная кислота
HSF	heat-shock transcription factor, транскрипционный активатор
HSP	heat shock proteins, белки теплового шока
K_d	константа диссоциации комплекса
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	бактериальная питательная среда Luna-Bertam
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption / ionization – time of flight, времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией методом лазерной матричной десорбции
N	любой нуклеотид (A, G, C, T)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDB	Protein Data Bank, банк пространственных структур макромолекул
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride, фенилметилсульфонилфторид
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Ser	серин, аминокислота
Ser-P	фосфорилированная форма серина
SINE-элементы	short interspersed elements, короткие мобильные генетические элементы (ретротранспозоны)
TSS	transcription start site, стартовая точка транскрипции

Для обозначения аминокислотных остатков, нуклеозидов, нуклеотидов, олиго- и полинуклеотидов использовали символы, рекомендованные Комиссией по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB).

ВВЕДЕНИЕ

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. Совершенно неожиданным стало открытие в прокариотах малых некодирующих 6S РНК, которые способны ингибировать транскрипцию за счет непосредственного связывания с холоферментом РНК-полимеразы (РНКП) и блокирования её активного центра [1]. Аналоги бактериальных 6S РНК, оказывающие различное действие на транскрипционный аппарат, были найдены в клетках высших эукариот, в том числе и человека (Alu РНК, 7SK и U1 мяРНК) [2]. Общность функциональных свойств этих некодирующих РНК (нкРНК) позволяет использовать 6S РНК прокариот в качестве модели для понимания основ нкРНК-зависимых механизмов регуляции транскрипции.

Основные исследования в данной области проведены для *Escherichia coli*, в клетках которой содержится только одна 6S РНК. Уникальной особенностью этой 6S РНК является возможность синтеза на её матрице коротких транскриптов – пРНК (от англ. «product RNA», рRNA), 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 [3].

Кроме *E. coli* наличие гена 6S РНК (*ssrS*) предполагается более чем в 130-ти видах бактерий [4], 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*.

Объектами нашего исследования являются две различные 6S РНК грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*, названные 6S-1 (*bsrA*) и 6S-2 (*bsrB*) РНК. 6S-1 РНК экспрессируется главным образом в стационарной фазе роста клеток, а максимальная экспрессия 6S-2 РНК приходится на экспоненциальную фазу [4]. Причины «появления» дополнительной 6S-2 РНК в условиях активного роста и деления клеток, а также её свойства и функции, неизвестны и требуют детального исследования.

Необходимость исследования механизмов транскрипции генов в бактерии *B. subtilis* связана с несколькими обстоятельствами. Прежде всего, *B. subtilis* является хорошо изученным организмом, и последовательность её генома полностью известна [5]. С клетками *B. subtilis* легко проводить разнообразные генетические манипуляции, поэтому данная бактерия часто выступает в качестве модельного организма в различных

исследованиях. Кроме того, *B. subtilis* является важным продуцентом протеаз, амилаз, аминокислот и некоторых полисахаридов, которые необходимы в народном хозяйстве. Некоторые штаммы *B. subtilis* также используются в качестве пробиотиков для приготовления лекарственных препаратов [6].

Целью данной 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*.

В результате проведенных исследований нами впервые продемонстрировано, что 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* способны ингибировать транскрипцию генов, взаимодействуя с РНКП, а также могут служить матрицами для синтеза пРНК. Показано, что экспрессия многих белков регулируется с помощью 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*, что свидетельствует о важной роли обеих 6S РНК для жизнедеятельности клетки.

Работа содержит обзор литературы, в котором рассматриваются примеры регуляции транскрипции с помощью некодирующих РНК (нкРНК) как в бактериях, так и в эукариотических клетках. Основное внимание уделено малым нкРНК, непосредственно взаимодействующим с РНК-полимеразой.

ГЛАВА I.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПОСРЕДСТВОМ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ПРОКАРИОТАХ И ЭУКАРИОТАХ

(Обзор литературы)

I.1. Природа и разнообразие некодирующих РНК

На сегодняшний день на основании данных транскриптомного анализа эукариотических геномов можно с уверенностью утверждать, что лишь 1-2% РНК в клетке кодирует белки, в то время как подавляющее большинство транскриптов является некодирующими РНК. «Репертуар» генов, кодирующих белки, по всей видимости, оставался относительно статичным в ходе эволюции, в то время как число некодирующих последовательностей заметно возросло при переходе к более сложным организмам. Данное наблюдение подтверждается большим количеством исследований, выявляющих все новые и новые биологические функции нкРНК. Поскольку уровень экспрессии большинства нкРНК достаточно низок по сравнению с мРНК, предполагается, что они выполняют, главным образом, регуляторные функции. Действительно, к настоящему моменту известно много фактов функционирования нкРНК в процессе развития клетки, при ответе на различные стрессы или изменения условий окружающей среды [7]. С функциями нкРНК связано большое количество часто разнонаправленных молекулярных механизмов, таких как активация транскрипции генов и подавление их экспрессии, импринтинг и деметилирование ДНК, интерференция РНК и ремоделирование хроматина. Кроме того, изменение уровня экспрессии тех или иных нкРНК отмечены при разных типах рака и неврологических заболеваниях. Таким образом, наличие неоспоримых свидетельств участия нкРНК во многих клеточных процессах позволяет сделать вывод об их исключительно важном значении для клетки [8].

Существует несколько различных классификаций нкРНК. В зависимости от длины все нкРНК могут быть разделены на три класса: (1) микроРНК и малые интерферирующие РНК (миРНК) длиной ~ 18-25 нуклеотидных остатков (н.о.), (2) малые нкРНК ~ 20-300 н.о., являющиеся, как правило, регуляторами транскрипции и трансляции и (3) длинные некодирующие РНК (lncRNA) >200-10000 н.о., роль которых в клетке многообразна. Функционально все нкРНК могут быть условно классифицированы на структурные и регуляторные. Постоянно экспрессирующимися структурными нкРНК являются в первую очередь рибосомные (рРНК), транспортные (тРНК), малые ядерные (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мякРНК). К основным регуляторным нкРНК могут быть отнесены микроРНК, миРНК, длинные некодирующие РНК, а также РНК,

взаимодействующие с piwi-белками¹ [7]. Недавно были также описаны два новых класса нкРНК: РНК, ассоциированные с промотором, и энхансерные РНК [9, 10].

Также можно отдельно выделить целый ряд регуляторных нкРНК, контролирующих транскрипцию в клетках эукариот. К ним относят прежде всего 7SK мяРНК и TAR РНК, регулирующие активность фактора элонгации Р-TEFb; U1 мяРНК, стимулирующую транскрипцию посредством связывания с инициаторным фактором TFIIF; SRA РНК, активирующую стероидные рецепторы и др. Данные нкРНК вовлечены в сложные многостадийные механизмы регуляции и взаимодействуют, как правило, с целым каскадом белков, оказывая, главным образом, косвенное воздействие на процесс транскрипции [2]. Тем не менее, существуют нкРНК, напрямую взаимодействующие с РНКП II – это B1 и B2 РНК мыши и Alu РНК человека.

Однако регуляция посредством нкРНК не является отличительной особенностью эукариот. Последние исследования позволили идентифицировать огромное количество малых нкРНК, выполняющих разные функции, в клетках *E. coli* и других бактериях. На данный момент известно более 140 бактериальных нкРНК, в том числе около 80 из них обнаружены в *E. coli* [11].

НкРНК помогают бактерии приспосабливаться к изменениям окружающей среды путем воздействия на инициацию транскрипции, пост-транскрипционную регуляцию, инициацию трансляции, модификацию мембран и на множество других процессов. Многие нкРНК являются крайне необходимыми регуляторными элементами при клеточном ответе на стресс, заражении бактериофагами [12, 13]. Большинство прокариотических регуляторных нкРНК выполняет свои функции за счет комплементарных взаимодействий с мРНК-«мишенями», и, как следствие, изменяет стабильность и/или влияет на трансляцию последних. Действуя пост-транскрипционно, такие нкРНК являются основными участниками отдельной стадии регуляции экспрессии генов, полностью независимой от процессов, происходящих при транскрипции мРНК [14]. Например, OxyS РНК транскрибируется в клетке в ответ на окислительный стресс и, взаимодействуя с участком связывания рибосомы мРНК некоторых генов, блокирует их трансляцию. Одной из мишеней OxyS РНК является ген *rpoS*, кодирующий σ^S -субъединицу РНКП. Интересно, что его трансляцию могут, наоборот, активировать другие малые нкРНК – RprA и DsrA РНК, экспрессирующиеся в условиях осмотического шока и при пониженных температурах, соответственно. Эти нкРНК взаимодействуют с 5'-областью мРНК гена *rpoS* и расплетают шпилечную структуру, препятствующую

¹ Piwi-белки (от англ. «P-element induced wimpy testis») – класс регуляторных белков, экспрессирующихся исключительно в зародышевых клетках млекопитающих и вовлеченных в процессы дифференциации стволовых клеток, сперматогенез и в «молчание» транскрипции генов ретротранспозонов.

посадке рибосомы [15]. Недавно было показано, что группа РНК-регуляторов, известная как CRISPR РНК (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), образует базовую адаптивную иммунную систему бактериальных клеток, формирующуюся при попадании в клетку плазмиды и при инфицировании её фагами. CRISPR РНК являются прокариотическим аналогом миРНК, и благодаря комплементационным взаимодействиям связывают фаговые ДНК и РНК, вызывая их последующую деградацию [16]. Похожую функцию выполняет RyhВ РНК, которая связывается с различными мРНК, что приводит к их последующему ферментативному гидролизу [15]. Чрезвычайно важной для клетки является и *rnp* РНК – каталитическая субъединица фермента РНКазы Р, осуществляющей процессинг пре-тРНК. Наконец, некоторые нкРНК непосредственно связываются с регуляторными белками и модулируют их активность. В настоящее время известно несколько таких нкРНК: CsrB/CsrC, RsmX/RsmY/RsmZ, Rsd и 6S РНК [12]. Предполагается, что принцип их действия основан на сходстве их вторичных структур с другими нуклеиновыми кислотами, являющимися мишенями для связывания белков.

Так, например, CsrB (~ 350 н.о.) и CsrC (~ 220 н.о.) РНК вместе с белком CsrA образуют так называемую регуляторную систему CsrABC (carbon storage regulator), встречающуюся в клетках *E. coli* и других бактерий. CsrABC отвечает в первую очередь за поддержание баланса между процессами синтеза гликогена из сахаров и его использования в процессе гликолиза, а также за образование внеклеточных компонентов движения [17]. Белок CsrA в свободной форме ингибирует трансляцию другого белка – GlgC, участвующего в синтезе гликогена. Связываясь в виде димера с нетранслируемой областью мРНК гена *glgC* вблизи последовательности Шайна-Дальгарно, CsrA препятствует посадке рибосомы и вызывает быструю деградацию *glgC*-транскриптов. В то же время взаимодействие белка CsrA с мРНК гена *flhDC* повышает стабильность последней, и, как следствие, активирует синтез в клетке флагеллина – основного компонента бактериальных жгутиков. CsrB и CsrC РНК состоят, соответственно, из 18 и 9 шпилек, петли которых содержат участок узнавания белка CsrA – последовательность 5'-GGA-3'. Как следствие, CsrC и CsrB РНК могут связывать до 9-18 молекул белка CsrA и не позволяют ему образовать комплексы с мРНК.

Аналогом регуляторной системы CsrABC в клетках *Pseudomonas fluorescens* и *Legionella pneumophila* является система RsmXYZ-RsmA. RsmY и RsmZ РНК длиной, соответственно, ~ 120 н.о. и ~ 130 н.о. представляют собой гомологи CsrB РНК *E. coli* и взаимодействуют *in vitro* с белком CsrA *E. coli* с достаточно высокой эффективностью, так как тоже содержат в петлях шпилечных структур мотивы 5'-GGA-3' (рис. I.1). Единичные нокауты генов *rsmY* и *rsmZ* практически не влияют на изменение вирулентности

L. pneumophila. Однако двойной нокаут генов приводит к значительному снижению эффективности деления *L. pneumophila* в клетках моноцитарно-макрофагального ряда человека и в амебе *Acanthamoeba castellanii*, а также к блокированию перехода клеток из стадии репликации в стадию трансмиссии [18]. Суперэкспрессия RsmY и RsmZ РНК приводила к активации синтеза гликогена и формированию биопленки, аналогично процессам в клетках *E. coli*. Некоторые виды бактерий рода *Pseudomonas* также содержат дополнительную гомологичную RsmX РНК длиной ~ 115 н.о. Интересно, что экспрессия RsmX/RsmY/RsmZ РНК активируется специальной двухкомпонентной белковой системой GacA/GacS (LetA/LetS). Белок GacA связывается в промоторной области генов *rsmX* и *rsmZ* со специфической палиндромной последовательностью 5'-d(TNAGAAATTTCTNA)-3' / 3'-d(ANTCTTTAAAGANT)-5' (N = A, T, C, G) и стимулирует их транскрипцию. Аналогичные системы были также найдены в клетках *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium* и *Yersinia pseudotuberculosis* [19].

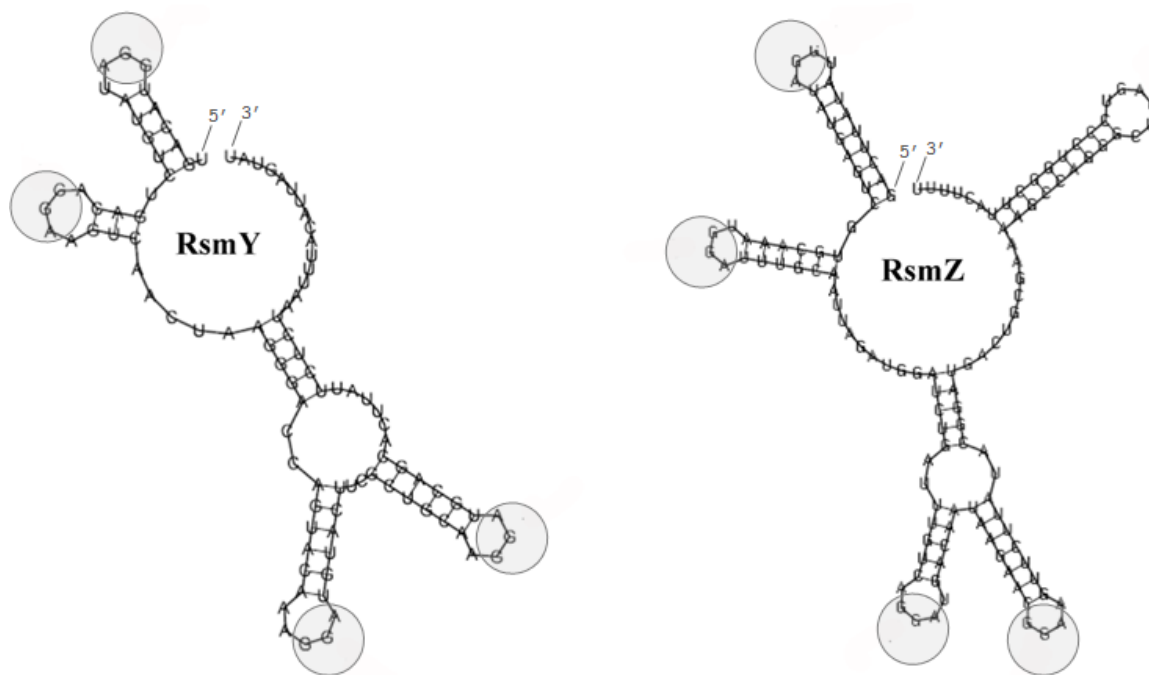


Рис. 1.1. Предсказанная вторичная структура RsmX и RsmZ РНК *L. pneumophila*. Серыми кругами выделены консервативные 5'-GGA-3'-мотивы, характерные для РНК, связывающих белок RsmA и его гомологи [18].

Еще одной малой нкРНК, связывающейся с белком и регулирующей тем самым его активность, является Rcd РНК длиной ~ 70 н.о., которая взаимодействует с триптофаназой TprA. Точный механизм данного процесса не изучен, однако Rcd РНК повышает сродство белка к триптофану и стимулирует синтез индола² в быстро делящихся клетках [20].

В отличие от описанных выше нкРНК, осуществляющих регуляцию конкретных специфических молекулярных процессов, в клетках прокариот существует еще одна РНК,

² В процессе каталитического разложения триптофана образуется пируват-ион, индол и аммиак.

являющаяся глобальным ингибитором транскрипции. Эта РНК, названная 6S РНК, непосредственно взаимодействует с бактериальной РНКП и блокирует её активный центр, предотвращая узнавание промоторов ДНК [1]. Проводя аналогию с эукариотическими нкРНК, взаимодействующими с РНКП II – можно однозначно говорить о существовании во всех живых системах отдельного механизма РНК-зависимого контроля транскрипции, возможно, имеющего для клетки не меньшее значение, чем регуляция с помощью белков. Таким образом, в настоящем обзоре основное внимание уделяется нкРНК, вовлеченным в процессы транскрипции в клетках низших и высших организмов и прямо или косвенно модулирующих активность основного транскрипционного фермента – РНКП.

I.2. 6S РНК - бактериальная некодирующая РНК, регулирующая транскрипцию

I.2.1. История открытия и первых исследований 6S РНК

Впервые 6S РНК была обнаружена в клетках *E. coli* штамма MRE600 Броунли и Сенгером при выделении ³²P-меченной 5S РНК для последующего определения нуклеотидной последовательности [21]. Впоследствии оптимизированный для ДНК протокол стал известен как «секвенирование по Сэнгеру», принесший автору Нобелевскую премию в 1980 г. Таким образом, 6S РНК была одной из самых первых молекул РНК, для которых была установлена нуклеотидная последовательность [22]. Тем не менее, её функциональная роль в клетке оставалась неизвестной на протяжении более 30 лет после открытия.

Выделенная из клеток *E. coli* 6S РНК имела длину 184 н.о. и демонстрировала на удивление высокую устойчивость молекулы к гидролизу. Предложенная авторами вторичная структура указывала на то, что 6S РНК не является матричной РНК. Тем не менее, 6S РНК присутствовала в больших количествах во всех протестированных линиях *E. coli*, а также была найдена в родственной *E. coli* грамотрицательной бактерии *Shigella dysenteriae* [22]. В ранней логарифмической фазе роста клеток *E. coli* 6S РНК практически не детектировалась, в то время как в поздней стационарной фазе была зафиксирована максимальная концентрация 6S РНК в количестве ~ 1000 копий на одну геномную ДНК [23].

Примерно в то же время из клеток *HeLa* была выделена РНК близкой молекулярной массы, названная 7S (7SL) РНК [24]. Было установлено, что 7SL РНК является продуктом ферментативного гидролиза рибосомной 28S РНК и непосредственно ассоциирована с рибосомой в составе рибонуклеопротеинового комплекса SRP, отвечающего за

котрансляционную транслокацию белков через мембрану эндоплазматического ретикула. Данный комплекс характеризовался коэффициентом седиментации 11S и состоял помимо 7SL РНК из 6 различных полипептидов. Обнаружение 6S РНК *E. coli* в составе аналогичного рибонуклеопротеинового комплекса 11S неизвестного состава, а также предсказанное сходство вторичных структур 7SL РНК человека и 6S РНК *E. coli* [25], позволило предположить общность их функций в качестве РНК-компонентов SRP-комплексов, регулирующих секрецию белков. Однако попытки заменить 7SL РНК человека на 6S РНК *E. coli* при реконструкции комплекса SRP человека не увенчались успехом [26]. В последующих исследованиях была зафиксирована транскрипция прекурсора 6S РНК *E. coli*, содержащего 8 дополнительных н.о. на 5'-конце молекулы, а также идентифицирован ген *ssrS*, кодирующий 6S РНК и представленный в геноме *E. coli* единственной копией [27]. Это позволило сконструировать мутантные клеточные линии *E. coli*. Однако нокаут гена 6S РНК, также как и его суперэкспрессия, абсолютно не влиял на жизнеспособность клеток и секрецию белков по сравнению с клетками дикого типа в температурном диапазоне 23–42°C. Полученные данные наглядно демонстрировали ошибочность существовавшей на тот момент гипотезы о функциональной роли 6S РНК в качестве компонента SRP-комплекса [28].

Немного позднее 6S РНК длиной ~ 180 н.о. была обнаружена в грамотрицательной эубактерии *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Как и в случае *E. coli*, в геноме *P. aeruginosa* присутствовала только одна копия гена, кодирующего 6S РНК. Определение нуклеотидной последовательности 6S РНК *P. aeruginosa* позволило рассчитать процент гомологии с 6S РНК *E. coli*, составивший всего 60%, в то время как гомология 5S РНК между соответствующими видами достигала 80%. Тем не менее, обе 6S РНК характеризовались приблизительно одинаковым содержанием G/C-пар: 60% и 55% для *E. coli* и *P. aeruginosa*, соответственно. Несмотря на то, что наиболее протяженный консервативный участок в последовательностях этих 6S РНК составлял всего 13 н.о., авторами были предложены сходные вторичные структуры для обеих 6S РНК (рис. I.2). По мнению проф. Эрдманна и соавт. обе молекулы представляют собой симметричные нерегулярные двухчепочные РНК с обширным расплетенным участком в центре. Интересным фактом являлась 100% гомология последовательностей длиной 9 н.о., расположенных в позициях 35-44 и 150-159, соответственно (рис. I.2). Однако на тот момент, авторами было лишь высказано предположение, что данные участки молекул, образующие соответствующие консервативные элементы вторичной структуры, могут отвечать за узнавание 6S РНК белками.

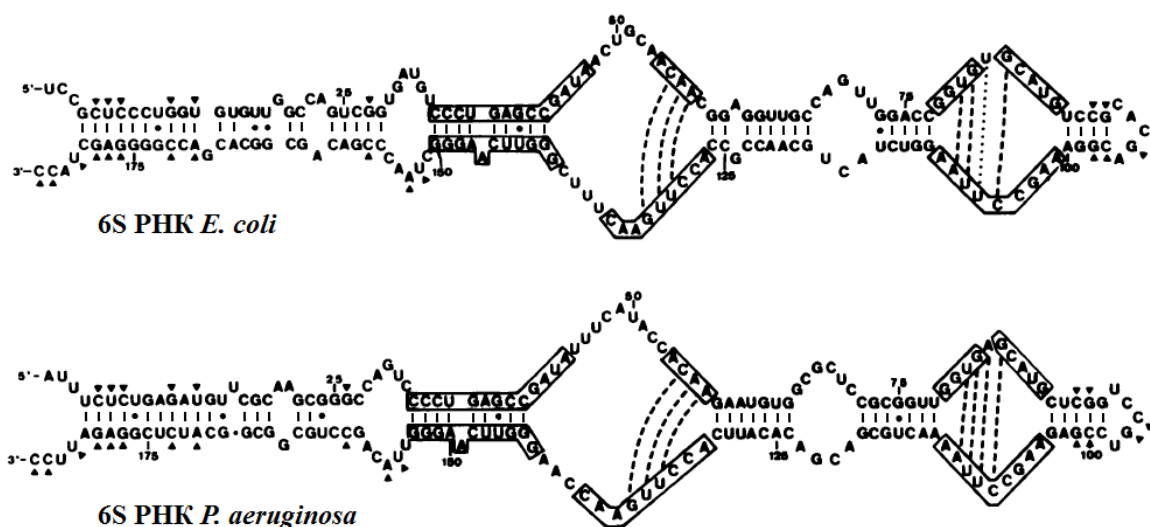


Рис. 1.2. Предполагаемые вторичные структуры 6S РНК *E. coli* и 6S РНК *P. aeruginosa*, предложенные в работе [29]. Гомологичные нуклеотиды отмечены треугольниками, идентичные участки молекул выделены рамками. Возможные неканонические комплементарные взаимодействия отмечены пунктирными линиями.

Попытки использовать ^{32}P -меченную 6S РНК *P. aeruginosa* в качестве зонда для гибридизации с геномными ДНК других бактерий (*Thermus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearotherophilus* и *Halobacterium salinarum*) не увенчались успехом, из чего был сделан вывод о низкой степени гомологии 6S РНК среди данных видов.

Таким образом, на протяжении 20-ти лет исследований с момента выделения и секвенирования ученым не удалось выявить функциональную роль 6S РНК в клетке. Поскольку манипуляции с геном *ssrS* не приводили к изменению фенотипа клеток, изучение структуры и свойств 6S РНК было приостановлено вплоть до 2000 г.

К тому времени в *E. coli* помимо рибосомной 5S и тРНК были обнаружены еще 9 некодирующих РНК, вовлеченных в различные механизмы регуляции клеточной жизнедеятельности [30]. Например, оказалось, что выделенная ранее 10S РНК, представляет собой смесь двух различных РНК одинаковой длины: 10Sa и 10Sb РНК (M2 и M1 РНК). M2 РНК является транспортно-матричной РНК (тмРНК), участвующей в терминации трансляции, а M1 РНК – рибонуклеиновой составляющей бактериальной РНКазы Р, ответственной за процессинг тРНК. РНК OxyS и DsrA вовлечены в процессы стрессового ответа клетки на присутствие перекиси водорода и понижение температуры, соответственно. Суперэкспрессия DicF РНК препятствует нормальному делению клетки. Большое количество нкРНК, взаимодействующих как с белками, так и с другими РНК, было найдено и в клетках эукариот. Такое многообразие функций лишь незначительного количества известных на тот момент малых нкРНК вызвало стремительно возрастающий интерес к данной теме и заставило ученых пересмотреть концепцию, согласно которой основные роли РНК в клетке отводились мРНК, рРНК и тРНК. Настоящим открытием

стало исследование, опубликованное в журнале *Cell* группой американских ученых под руководством проф. Вассарман [1], которые впервые показали, что 6S РНК *E. coli* может служить глобальным ингибитором транскрипции за счет непосредственного связывания с РНК-полимеразой *E. coli*. Данная работа представляла собой полноценное и детальное исследование, позволившее не только констатировать факт участия 6S РНК в регуляции транскрипции, но и предположить и частично доказать конкретный механизм функционирования 6S РНК в клетке, актуальный и к настоящему моменту.

1.2.2. 6S РНК Escherichia coli

1.2.2.1. Функция 6S РНК

РНКП является одним из важнейших ферментов в клетке, осуществляющим синтез РНК с ДНК-матрицы. Бактериальная РНКП, как правило, состоит из 5 субъединиц: двух α , β , β' и ω , образующих так называемый кор-фермент, способный к элонгации транскрипции. Однако узнавание промоторов и инициация транскрипции возможны только холоферментом РНКП, содержащим в своем составе дополнительную субъединицу σ . В нормальных условиях роста клетки основным фактором транскрипции в *E. coli* является σ^{70} , тем не менее были обнаружены как минимум 7 дополнительных вариантов σ -факторов, ответственных за транскрипцию с тех или иных промоторов, в том числе в стрессовых условиях [31].

Правильное функционирование клетки обеспечивается существованием разнообразных способов регуляции транскрипции практически на любой из стадий, главным образом при участии активаторов или ингибиторов транскрипции белковой природы. Поэтому совершенно неожиданным оказался тот факт, что данную функцию может выполнять малая некодирующая 6S РНК. Еще в 1978 г. было показано, что коэффициент седиментации клеточного экстракта *E. coli*, содержащего 6S РНК, составляет $\sim 11S$, в то время скорость осаждения депротеинезированной 6S РНК соответствует 6S [23]. Таким образом, большая часть 6S РНК в клеточном экстракте находится в связанном с другими молекулами виде. Впервые состав фракции 11S клеточного экстракта из штамма *E. coli* K12 удалось охарактеризовать лишь в 2000 г. [1]. Выделенный из данного комплекса белок массой ~ 40 кДа был идентифицирован методом масс-спектрометрического анализа как α -субъединица РНК-полимеразы *E. coli*, а два более тяжелых белка массами ~ 150 кДа представляли собой β - и β' -субъединицы. Взаимодействие 6S РНК с РНКП являлось специфичным: при соосаждении РНКП антителами к кор-ферменту 6S РНК являлась единственным лигандом нуклеотидной природы, присутствие которого детектировалось в осажденных фракциях.

При использовании нокаутной по гену *ssrS* клеточной линии никаких РНК, соосаждающихся с ферментом, зафиксировано не было. Соосаждение 6S РНК с РНКП наблюдалось только в случае холофермента, содержащего σ^{70} -субъединицу, и не обнаруживалось в случае кор-фермента РНКП или холофермента РНКП, содержащего фактор σ^{32} (активный при стрессовых ответах). Позднее незначительное связывание 6S РНК было продемонстрировано также в случае σ^S -РНКП, транскрибирующей гены, активные в стационарной фазе роста клетки [32]. С помощью кросслинкинга под действием УФ-света РНКП *E. coli* с гомологичной 6S РНК из *Haemophilis influenza*, было установлено, что 6S РНК образует контакты как с σ^{70} -субъединицей белка, так и с β - и β' -субъединицами [1].

Количественно содержание 6S РНК в экспоненциальной и стационарной фазах роста было оценено, соответственно, как ~ 1000 и ~ 10000 копий на одну клетку. Более того, практически вся σ^{70} -РНКП после роста клеток в течение суток оказывалась в комплексе с 6S РНК, тогда как σ^S -РНКП оставалась активной [1]. Позднее показали [3, 33], что максимальная концентрация 6S РНК наблюдается на стадии выхода клетки из стационарной фазы при попадании в благоприятные условия.

На примере σ^{70} -зависимого промотора гена *rsd* было продемонстрировано, что присутствие 6S РНК значительно снижает уровень транскрипции данного гена. Впоследствии показали, что нокаут гена 6S РНК вызывает повышение уровня транскрипции σ^{70} -зависимых промоторов, предпочтительно содержащих расширенный -10 промоторный элемент с d(TG) в -12 положении и «слабую» -35 промоторную область [34]. То есть в нормальных условиях 6S РНК выступает как глобальный ингибитор транскрипции значительного числа генов.

В работе [35] было проведено сравнение полных транскриптомов клеток *E. coli* дикого типа и нокаутной по гену 6S РНК клеточной линии в средней логарифмической и ранней стационарной фазах роста. В общей сложности было выявлено 518 генов, экспрессия которых изменялась в отсутствие 6S РНК более чем в 1,5 раза, причем как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения. Из них 245 генов были активны в экспоненциальной, и 273 – в стационарной фазах клеточного роста. Изменение уровня экспрессии наблюдалось для белков, чьи промоторы являлись как σ^{70} -, так и σ^{38} -, σ^{32} - и σ^{24} -зависимыми. Как было установлено, многие гены, подверженные регуляции 6S РНК, кодируют транскрипционные факторы (активные, главным образом, в стрессовых условиях), транспортные белки и ферменты, вовлеченные в метаболизм пуринов. Нельзя однозначно утверждать, что влияние 6S РНК на экспрессию того или иного белка является прямым следствием изменения уровня транскрипции его мРНК. По всей видимости,

многие наблюдаемые эффекты носят косвенный характер, особенно с учетом 6S РНК-зависимой регуляции экспрессии транскрипционных факторов. Кроме того 6S РНК косвенно может влиять и на синтез регуляторов небелковой природы. Например, отсутствие 6S РНК в стационарной фазе роста клетки вызывало уменьшение уровня экспрессии белков трансляционного аппарата и рРНК. Однако такой эффект связывают с увеличением в мутантной клеточной линии концентрации ppGpp – гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфата – основного транскрипционного эффектора в условиях аминокислотного голодания³. ppGpp может связываться с РНКП вблизи активного центра и в зависимости от его ориентации (5' или 3'), ингибировать или, наоборот, активировать каталитическую активность белка [36].

Таким образом, очевидно, что 6S РНК играет важнейшую роль в жизнедеятельности клетки, а её функция распространяется не только на σ^{70} -зависимые промоторы генов, активных в стационарной фазе роста, но и на огромное количество других генов, активных в тех или иных условиях. Отсутствие фенотипа нокаутных по 6S РНК клеточных линий, по всей видимости, связано с существованием альтернативных способов регуляции транскрипции (в том числе активируемых при дефекте синтеза 6S РНК), которые полностью или частично компенсируют её отсутствие в клетке.

1.2.2.2. Генетическая организация гена *ssrS*, процессинг 6S РНК

Ген *ssrS*, кодирующий 6S РНК *E. coli*, транскрибируется совместно с геном *ugfA* с двух промоторов P1 (проксимальный) и P2 (дистальный) (рис. 1.3) с последующим разрезанием бицистронной РНК [37]. Функция белка, кодируемого геном *ugfA*, была выявлена относительно недавно [38] и, по всей видимости, никак не связана с ролью 6S РНК в клетке. Он является 5-формилтетрагидрофолатциклолигазой и ингибирует активность различных фолат-зависимых ферментов. Ген *ugfE*, расположенный непосредственно перед геном *ssrS*, кодирует белок ZapA (Z-ring-associated protein A), который участвует в полимеризации белка FtsZ (производное от filamenting temperature-sensitive mutant Z) в так называемое Z-кольцо, формирующее перегородку между двумя дочерними клетками.

Оба промотора, с которых происходит транскрипция гена *ssrS*, активны *in vivo*. В экспоненциальной фазе роста клеток промотор P1 в 3 раза сильнее, чем P2, а при переходе в позднюю стационарную фазу активность обоих промоторов увеличивается одинаково. Транскрипция с P2 может осуществляться как σ^{70} -РНКП, так и σ^S -РНКП, в то время как P1 является исключительно σ^{70} -зависимым. Таким образом, в экспоненциальной

³ ppGpp синтезируется белком RelA, ассоциированным с рибосомой, в том случае, если А-участок рибосомы занят деацелированной тРНК [36].

фазе роста клетки транскрипция 6S РНК происходит одновременно с двух промоторов. При переходе в стационарную фазу проксимальный промотор становится неактивным, а транскрипция с дистального промотора продолжается.

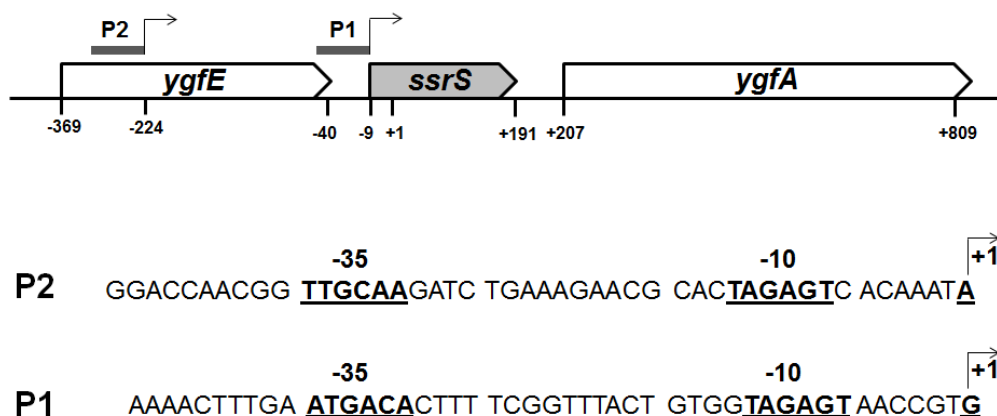


Рис. I.3. Схема расположения гена *ssrS*, кодирующего 6S РНК в *E. coli*, и его промоторных областей P1 и P2. Элементы -35 и -10 промоторов P1 и P2 и стартовые точки транскрипции (отмечены стрелками) подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Цифрами указана относительная позиция того или иного элемента относительно начала гена *ssrS* (+1). Индекс d (дезоксид) при написании последовательностей ДНК опущен.

Поскольку ингибирование транскрипции в присутствии 6S РНК наблюдается главным образом в случае σ^{70} -зависимых промоторов, можно предположить, что 6S РНК может ингибировать и свою собственную транскрипцию. Для изучения такой возможности в работе [39] P1 и P2 промоторы гена *ssrS* были клонированы в промоторную область гена *lacZ*. Было показано, что нокаут гена 6S РНК никак не влияет на эффективность транскрипции её собственных промоторов *in vivo*. В то же время суперэкспрессия 6S РНК вызывала повышение уровня транскрипции с промотора P1 и понижала активность промотора P2.

В условиях *in vitro* было показано, что ДНК-связывающий белок Fis, регулирующий экспрессию большого количества генов за счет суперскручивания хромосомы *E. coli*, уменьшал уровень транскрипции 6S РНК с промотора P2 и незначительно усилил транскрипцию с промотора P1 [40]. Поэтому нельзя исключить тот факт, что транскрипция 6S РНК регулируется специальными транскрипционными факторами, однако на сегодняшний день в литературе описано крайне мало таких случаев, и их корреляция с процессами *in vivo* остается под вопросом.

Наличие двух стартовых точек транскрипции гена *ssrS* обуславливает существование двух форм предшественников 6S РНК – длинной и короткой, оба варианта впоследствии подвергаются процессингу с 5'-конца эндорибонуклеазами: РНКазой E в случае P1-транскрипта и РНКазой E и G в случае P2-транскрипта (рис. I.4) [41]. Оба варианта пре-6S РНК подвергаются процессингу с одинаковой эффективностью, таким образом, вклад каждого из промоторов в уровень синтеза 6S РНК зависит только от его активности

на той или иной стадии клеточного роста [39]. Ферменты, гидролизующие пре-6S РНК с 3'-конца, пока не идентифицированы.

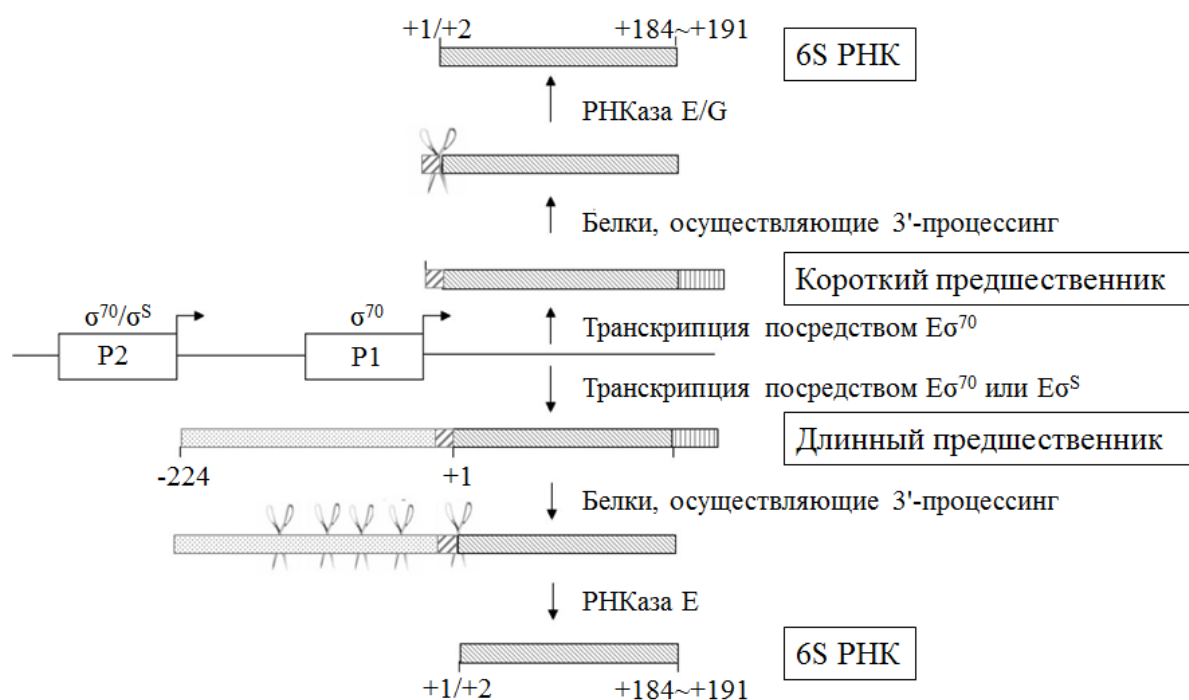


Рис. I.4. Модель биогенезиса 6S РНК в клетках *E. coli*. Холоферменты РНКП, содержащие различные σ -факторы обозначены как σ^{70} и σ^S [41].

Впервые вторичная структура 6S РНК была установлена экспериментально в 2005 г. с помощью метода ферментативного пробинга (рис. I.5) [3]. В том же году были опубликованы данные сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей предсказанных 6S РНК из 14 различных бактерий (рис. I.6). Несмотря на низкий процент гомологии первичной структуры 6S РНК, все проанализированные последовательности содержали 4 консервативных элемента CRI–CRIV, а также с высокой вероятностью образовывали протяженную шпильку с большим расплетенным участком в центре со стороны 5'-конца молекулы [42].

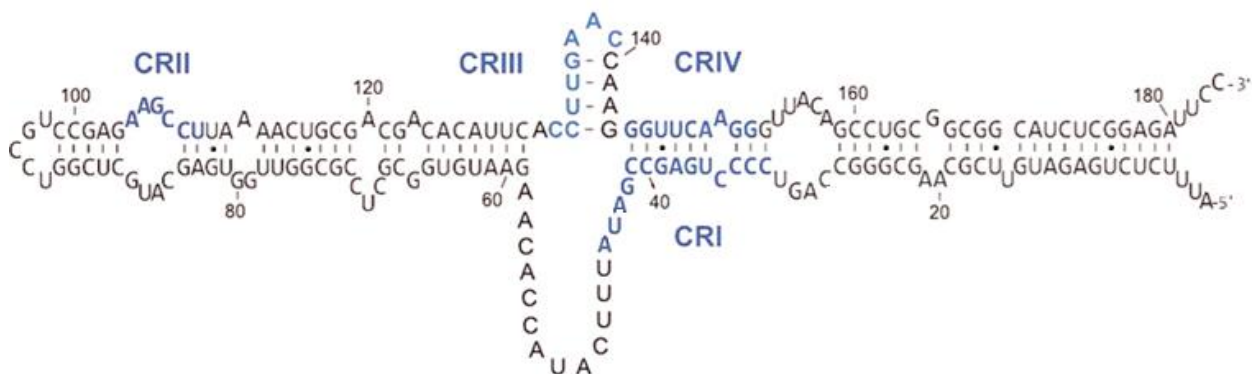


Рис. I.5. Вторичная структура 6S РНК *E. coli* [43]. Консервативные элементы CRI-CRIV выделены синим шрифтом.

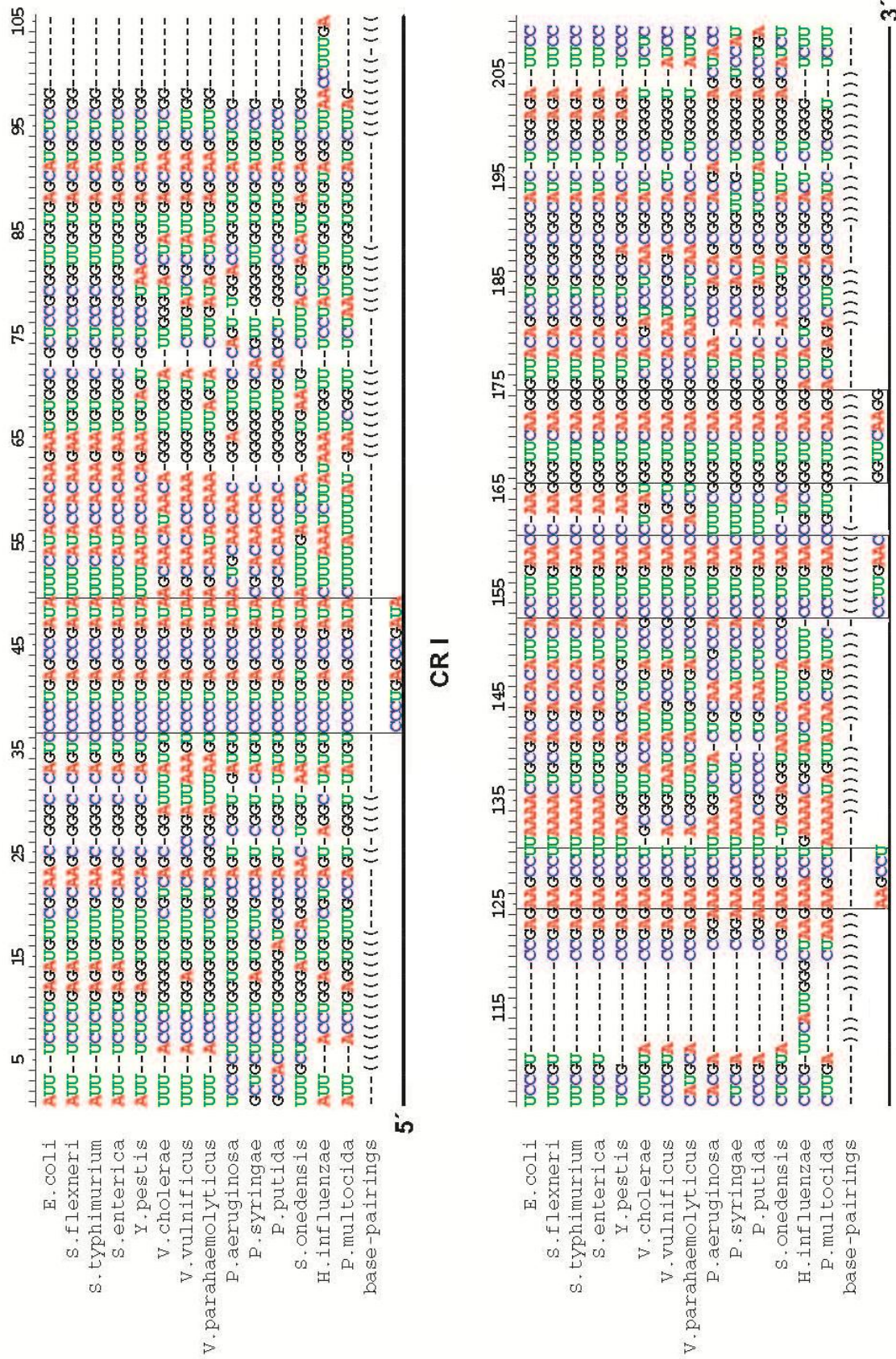


Рис. 1.6. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 14-ти 6S РНК из различных бактерий на основе данных BLAST. Консервативные элементы 6S РНК отмечены как CRI-IV [42]. Символом «(» и «)» обозначены н.о., участвующие в комплементарных взаимодействиях.

1.2.2.3. Механизм функционирования 6S РНК как регулятора транскрипции

Высокая консервативность вторичной структуры 6S РНК среди различных классов бактерий наряду с отсутствием существенной гомологии первичных последовательностей 6S РНК свидетельствовала о важности именно конформации этой нкРНК для её функционирования. Было высказано предположение о том, что 6S РНК имитирует промотор ДНК в его «открытом» комплексе с РНКП, что обеспечивает ее связывание с ферментом [4, 44].

В дальнейшем было установлено, что 6S РНК *E. coli*, так же, как и промотор ДНК, взаимодействует с районом 4.2 σ^{70} -субъединицы РНКП, хотя участки связывания 6S РНК и -35 элемента промотора ДНК полностью не совпадают, но перекрываются (рис. 1.7). Следовательно, в основе механизма 6S РНК-зависимого ингибирования транскрипции лежит конкуренция между 6S РНК и -35 промоторной областью ДНК [45].

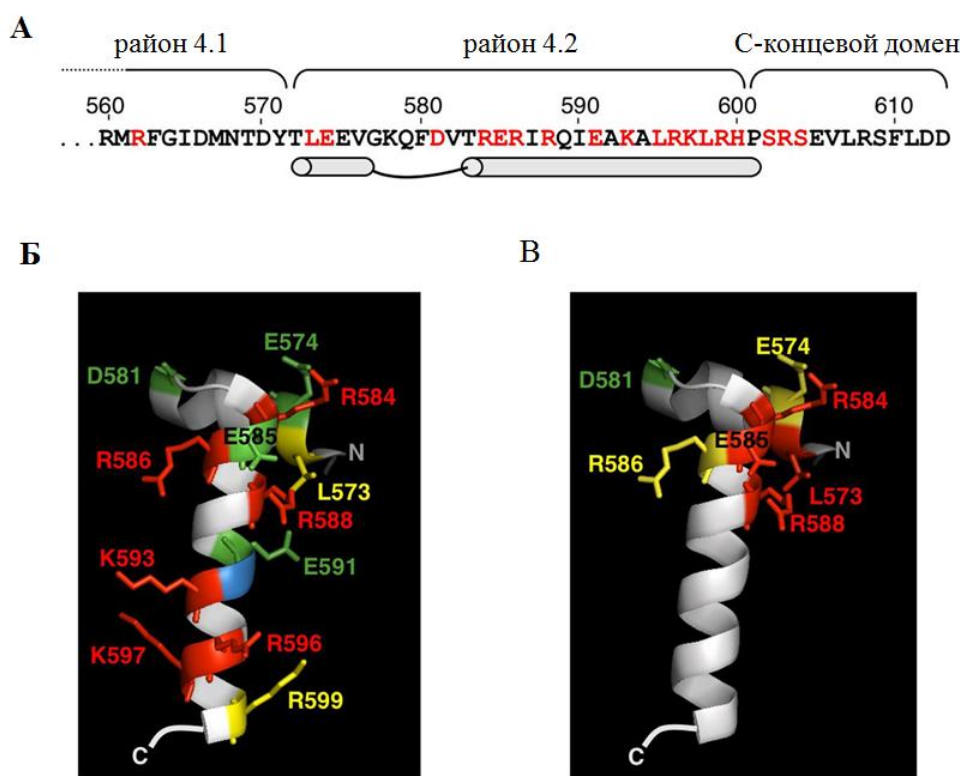


Рис. 1.7. Различия в связывании 6S РНК и промотора ДНК с С-концом σ^{70} -субъединицы РНКП. (А) Аминокислотная последовательность районов 4.1, 4.2 и С-концевого домена σ^{70} ; а.о. замененные на Ala выделены красным. (Б, В) Влияние аминокислотных замен на связывание с 6S РНК или ДНК, соответственно: красным цветом выделены а.о., замены которых заметно ухудшали связывание; желтым цветом обозначены а.о., замены которых вызывали незначительное понижение сродства белка к лиганду; зеленым цветом отмечены а.о., замены которых увеличивали степень связывания [45].

Неожиданным открытием стала обнаруженная способность 6S РНК, связываясь с активным центром РНКП, служить матрицей для синтеза РНК-продуктов *de novo* (рис. 1.8) [3]. Такие короткие транскрипты длиной 18-24 н.о. были названы пРНК (pRNA, «product» RNA). В данном случае ДНК-зависимая РНК-полимераза

проявляла свою исключительную способность выступать в роли РНК-зависимого фермента, о чем не было известно ранее. Открытие в дальнейшем аналогичного процесса для В2 РНК мыши (см. раздел I.3.2.2) заставило ученых пересмотреть концепцию контроля функционирования РНК-полимеразы исключительно молекулами белков и, по всей видимости, стало отправной точкой для открытия независимого механизма регуляции активности РНКП с помощью некодирующих РНК.

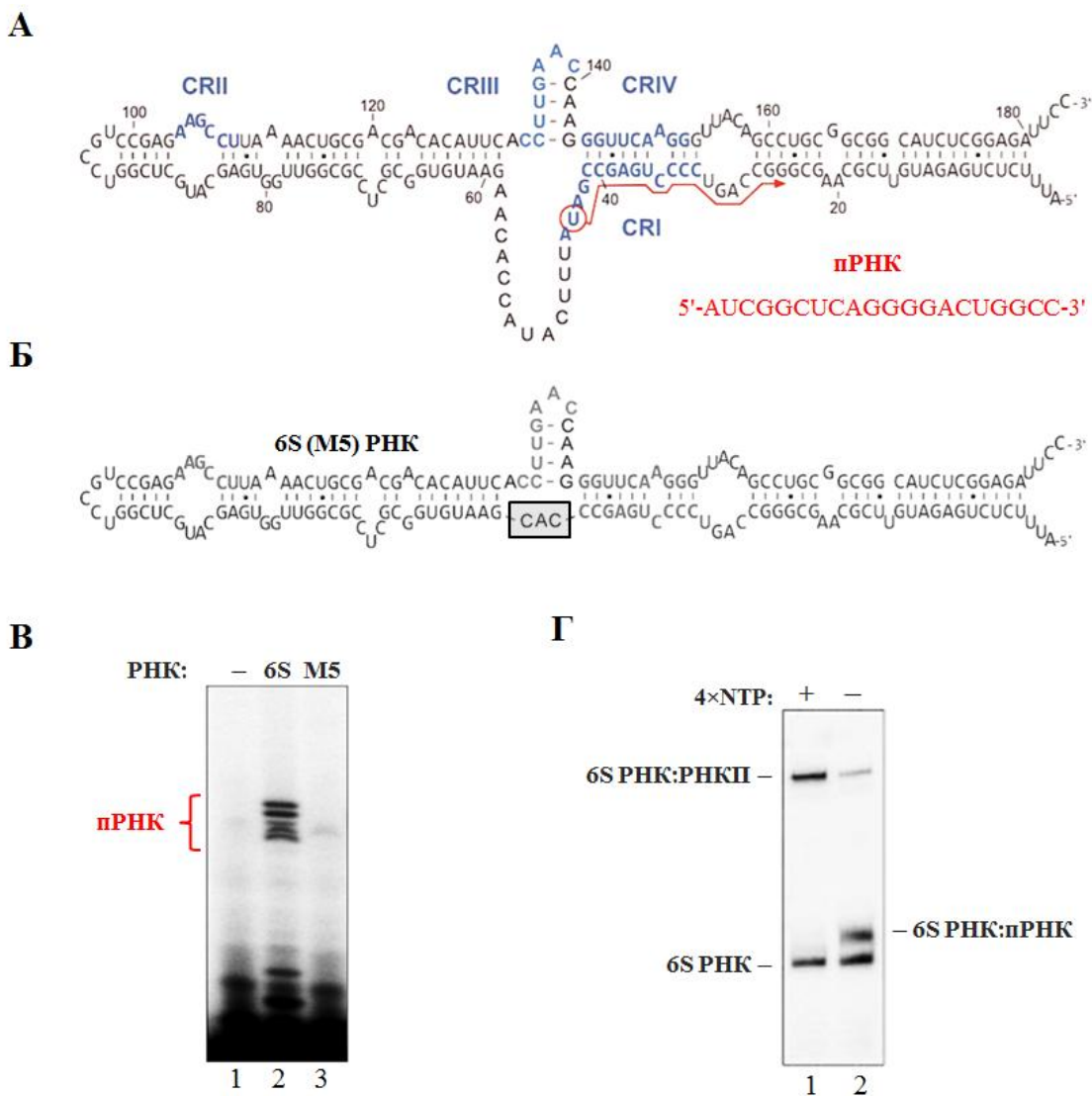


Рис. 1.8. Синтез транскриптов (пРНК) на матрице 6S РНК *E. coli* (А) Последовательность пРНК и расположение стартовой точки инициации её транскрипции (U44, выделен красным кружком) в 6S РНК *E. coli*. (Б) Нуклеотидная последовательность мутантной 6S (M5) РНК, лишенной центрального петли. (В) Транскрипция *in vitro* в присутствии [α - 32 P]СТР с матрицы 6S РНК (дорожка 2), M5 РНК (дорожка 3) и в отсутствие РНК (дорожка 1, отрицательный контроль). Радиоавтограф геля. (Г) Комплексообразование 6S РНК с РНКП в отсутствие NTP (дорожка 1) и в присутствии смеси четырех NTP (дорожка 2). Радиоавтограф геля [3].

Как и при транскрипции с промотора ДНК, синтез пРНК на 6S РНК в качестве матрицы начинается с определенного нуклеотида внутри центрального расплетенного участка – транскрипционного «пузыря», аналогично обычному процессу транскрипции. Для 6S РНК *E. coli* было определено точное положение стартовой точки транскрипции –

U44 (рис. I.8B). Как правило, в ходе транскрипции *in vitro* наблюдали синтез целого ряда пРНК различной длины от 2 до 18-24 н.о. с существенным преобладанием более длинных продуктов (рис. I.8B).

Аналогичный процесс наблюдается и при abortивной транскрипции с промотора ДНК, когда РНКП, практически не изменяя своего положения относительно стартовой точки транскрипции, синтезирует короткие РНК-«затравки» длиной, как правило, не более 15 н.о. [46]. Однако, в отличие от обычных abortивных РНК, быстро диссоциирующих из комплекса РНКП с промотором, пРНК остаются связанными с 6S РНК за счет комплементарных взаимодействий и образуют гибридный комплекс, легко детектируемый при проведении экспериментов методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. I.8Г). Такой комплекс является достаточно стабильным и характеризуется меньшей подвижностью в геле, чем свободная 6S РНК. Помимо этого, образование гибрида 6S РНК:пРНК приводит к его диссоциации из комплекса с РНКП. Добавление рифампицина (антибиотика, блокирующего активный центр РНКП) предотвращает синтез пРНК, и, как следствие, образование гибридных комплексов [3; 33]. Удаление центральной области 6S РНК также исключает возможность синтеза пРНК (рис. I.8Б, В).

Изучение механизма синтеза пРНК *E. coli* и его влияния на дестабилизацию комплекса 6S РНК с РНКП проведено в работе [43]. Было высказано предположение, что синтез пРНК вызывает конформационные изменения 6S РНК. По-видимому, образование дуплекса между пРНК и комплементарным участком в 6S РНК нарушает вторичную структуру последней, что приводит к коллапсу центрального петли, образованию неструктурированных участков и, как следствие, диссоциации 6S РНК из комплекса с ферментом. Было показано, что предварительно сформированный 6S РНК:пРНК гибрид не способен связывать РНКП. Результаты химического и ферментативного пробинга *in vitro* комплекса 6S РНК:пРНК в сравнении со свободной 6S РНК позволили предсказать возможное изменение её конформации (рис. I.9). Образование дуплекса между пРНК и 24-44 н.о. 6S РНК приводит к разрушению двухцепочечной области, фланкирующей центральную петлю со стороны 5'-конца свободной 6S РНК. Также велика вероятность образования короткой шпильки в районе 53-66 н.о. молекулы. Однако наиболее характерным изменением является «замена» короткой шпилечной структуры, расположенной напротив центральной петли с «3'-стороны» 6S РНК, на стабильную удлиненную шпильку в районе 132 – 152 н.о.: протяженная шпилечная структура образуется непосредственно между консервативными элементами CRIII и CRIV, и вероятно имеет важное значение для функции 6S РНК (рис. I.9).

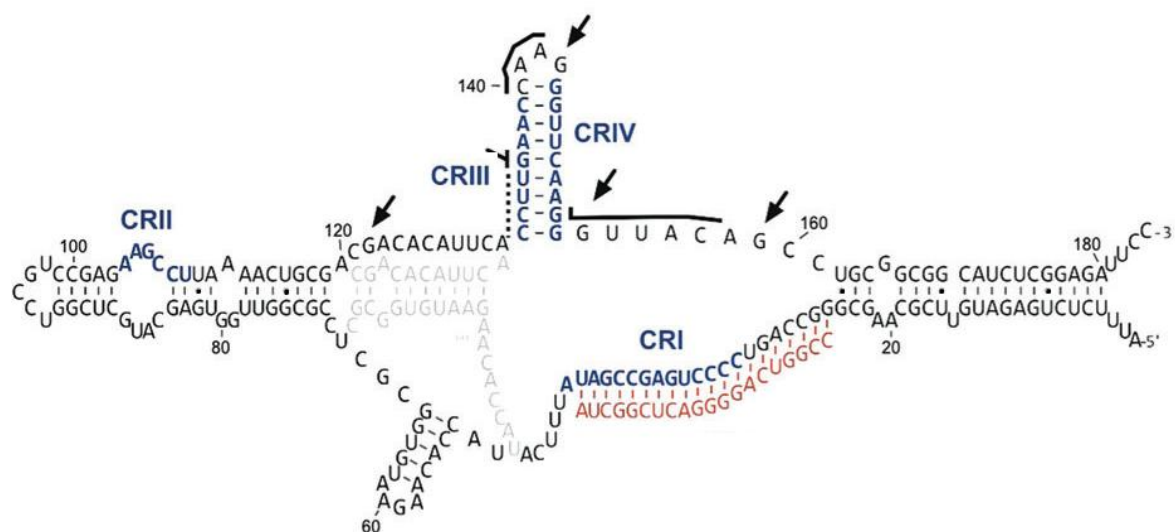


Рис. I.9. Вторичная структура комплекса 6S РНК *E. coli* с комплементарной пРНК длиной 20 н.о. (выделена красным) [43]. Серым шрифтом выделен участок 6S РНК в «свободной» конформации до синтеза пРНК. Консервативные элементы 6S РНК CRI-CRIV выделены синим шрифтом. Пунктирной линией отмечен участок 6S РНК, ставший доступным для гидролиза РНКазой V1, сплошной линией – участки самопроизвольного гидролиза при выдерживании 42 ч при температуре 23°C в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,5) и 20 мМ MgCl₂ («in-line» probing). Стрелками отмечены остатки G, межнуклеотидная связь после которых гидролизовалась в присутствии РНКазы T1. Черной точкой отмечен остаток G, гидролиз межнуклеотидной связи после которого уменьшался при образовании комплекса с пРНК.

Также в работе [43] было проведено изучение конформационных изменений в 6S РНК *E. coli* при синтезе пРНК в условиях *in vivo*. В клеточную культуру добавляли диметилсульфат (ДМС), метилирующий неспаренные остатки аденина и цитозина. Модифицированные н.о. 6S РНК затем идентифицировали с помощью обратной транскрипции (метод «удлинения праймера»). Для детекции изменений во вторичной структуре 6S РНК использовали клетки, находящиеся в стационарной фазе роста (когда синтез пРНК минимален) и клеточную культуру после разбавления свежей культуральной средой (когда синтез пРНК максимален). Было продемонстрировано, что эффективность модификации *in vivo* н.о. A137-A142, C148-G151 в 6S РНК во втором случае существенно снижалась, что свидетельствует об образовании удлиненной шпильки за счет дополнительных комплементарных пар между участками CRIII и CRIV (рис. I.9). По всей видимости, существует определенное равновесие между двумя конформациями 6S РНК – более «расплетенной» с длинной центральной шпилькой и более компактной с короткой шпилькой напротив центральной петли. Синтез пРНК необратимо смещает равновесие в сторону первой конформации, и тем самым вызывает диссоциацию РНКП из её комплекса с 6S РНК.

В группе проф. Вагнера [47] была предпринята попытка выявить н.о. 6S РНК, сближенные с активным центром РНКП. Напомним, что ранее в работе [45] были установлены а.о. в σ^{70} (рис. I.7), при замене которых на Ala степень связывания 6S РНК с

холоферментом σ^{70} -РНКП изменялась. Для картирования РНК-белковых контактов в работе [47] был применен новый подход с использованием химической нуклеазы FeVAВЕ⁴. Для этого был получен ряд мутантных форм σ^{70} -субъединицы РНКП, содержащих единственный остаток Cys в различных позициях (рис. I.10А), предположительно вовлеченных в узнавание промотора. Сульфгидрильная группа остатка Cys реагировала с бромацетамидобензильной функциональной группой в FeVAВЕ с образованием конъюгата σ^{70} -FeVAВЕ. После реконструкции холофермента РНКП, содержащего FeVAВЕ, проводили комплексообразование с 6S РНК. При добавлении в реакционную смесь аскорбата натрия и пероксида водорода происходил гидролиз межнуклеотидной связи в 6S РНК, сближенной с той или иной мутантной формой σ^{70} -FeVAВЕ-РНКП (рис. I.10Б, 10В).

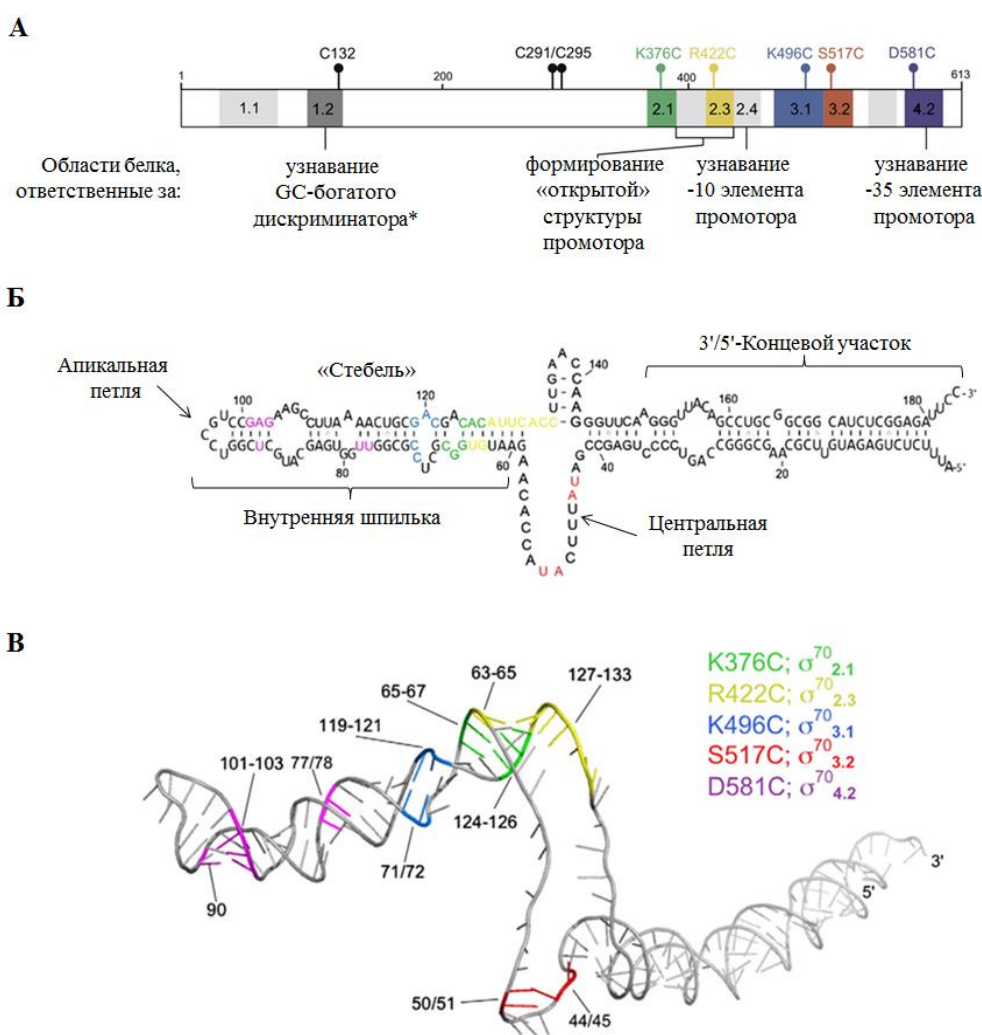


Рис. I.10. (А) Схема расположения подвергнутых замен а.о. в σ^{70} -субъединице РНКП. (Б) Вторичная структура и (В) трехмерная модель 6S РНК *E. coli*, соответственно [47]. Цветом выделены н.о., сближенные с а.о. мутантных форм σ^{70} : с K376C – зеленые, R422C – желтые, K496C – синие, S517C – красные, D581C – фиолетовые.

* GC-богатый дискриминатор – последовательность в ДНК, важная для узнавания промотора в условиях аминокислотного голодания.

⁴ (S)-1-(p-бромацетамидобензил)этилендиаминтетраацетат железа (III).

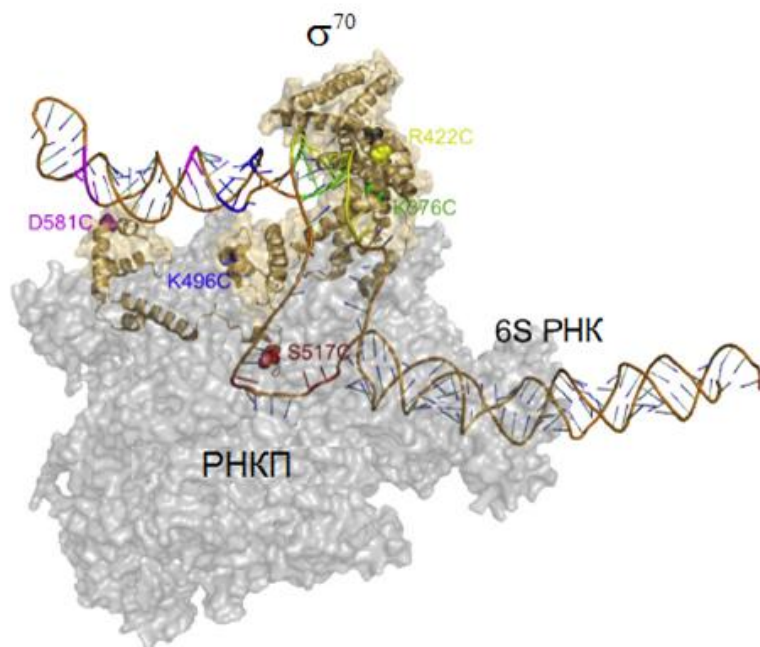
Было установлено, что 4.2 район σ^{70} , узнающий -35 промоторный элемент в ДНК, взаимодействует с двумя участками во внутренней шпильке 6S РНК (77-78 н.о. и 101-103 н.о.). Домены 3.1, 2.1 и 2.3 σ^{70} , вовлеченные в связывание и «расплавление» участка ДНК между -35 и -10 промоторными элементами, находятся вблизи основания «стебля» внутренней шпильки – нерегулярного двухцепочечного участка, фланкирующего центральную петлю с 3'-конца молекулы. U44 вместе с тремя другими н.о. центральной петли (A45, A50, U51) образует контакты с 3.2 районом σ^{70} -субъединицы, расположенным вблизи активного центра РНКП, что согласуется с его функцией в качестве стартового нуклеотида при синтезе пРНК. Таким образом, во взаимодействии с σ^{70} -субъединицей принимает участие только «половина» молекулы 6S РНК (42-143 н.о.). 3'-/5'-Концевой двухцепочечный участок 6S РНК может выполнять структурную функцию, а также взаимодействовать с β/β' -субъединицами РНКП.

На основе полученных результатов и предсказания третичной структуры двухцепочечных сегментов 6S РНК с помощью программы 3dRNA была создана модель трёхмерной структуры полноразмерной 6S РНК (рис. I.10B) [47]. Методом молекулярного докинга проведено наложение полученной модели на кристаллическую структуру холофермента σ^{70} -РНКП *E. coli* (PDB-код: 4IGC, рис. I.11). Для правильного позиционирования 6S РНК использовали трехмерную модель σ^{70} -РНКП *E. coli* в комплексе с CAP⁵-зависимым промотором ДНК (PDB-код: 3IYD) [48]. Как видно из рис. I.11A, 3D-модель 6S РНК идеально вписывается в кристаллическую структуру холофермента σ^{70} -РНКП. Все участки 6S РНК, для которых было продемонстрировано взаимодействие с теми или иными доменами σ^{70} , находятся в непосредственной близости от подвергнутых заменам а.о. Центральная петля 6S РНК (42-58 н.о.) повторяет геометрию транскрипционного «пузыря» в ДНК-промоторе (от -11 до +5 н.о. относительно положения TSS), а участок 6S РНК 59-93 н.о. имитирует промоторную область ДНК от -12 до -42 н.о. относительно TSS. Два участка гидролиза 6S РНК при образовании комплекса с РНКП-FeBAVE-S517C – U44/A45 и A50/A51 – расположены непосредственно в активном центре фермента с двух сторон от Ser517. Короткая шпилька 133-143 н.о. (рис. I.10Б), существующая в «свободной» конформации 6S РНК (согласно вторичной структуре), при связывании с РНКП, по всей видимости, «расплавляется» с образованием неструктурированного участка. Этот участок 6S РНК на 4 н.о. короче соответствующей области в ДНК-промоторе (рис. I.11Б), поэтому изгиб молекулы РНК в данном месте меньше по сравнению с ДНК. Однако ширина НК-связывающего канала в

⁵ Catabolite activator protein – активатор катаболитных оперонов. Гомодимер CAP в комплексе с двумя молекулами циклического АМР связывается с промоторами и активирует транскрипцию.

РНКП является достаточной для размещения 6S РНК в такой конформации. Предполагается, что расплетенный участок РНК в районе 85-88 н.о. и 104-107 н.о. искажает регулярную А-форму двухцепочечной спирали РНК, расширяя большую бороздку и тем самым делая её более доступной для взаимодействия с СПС⁶-мотивом района 4.2 σ^{70} -субъединицы [49].

А



Б

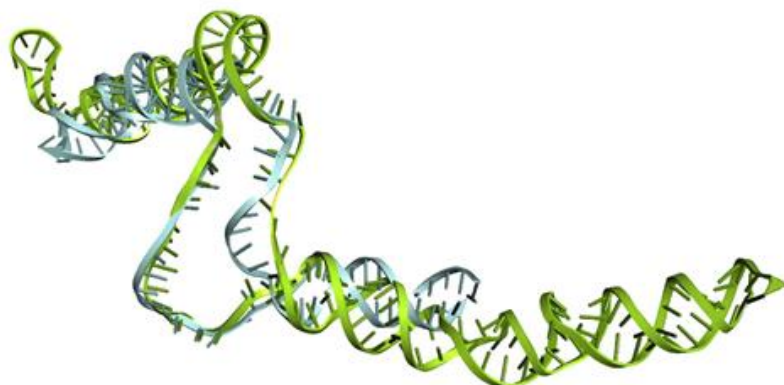


Рис. I.11. (А) Трехмерная модель 6S РНК *E. coli* в комплексе с холоферментом σ^{70} -РНКП [47]. Подвергнутые замене а.о. σ^{70} -субъединицы выделены цветом: K376C – зеленым, R422C – желтым, K496C – синим, S517C – красным, D581C – фиолетовым. Н.о., образующие контакты с той или иной мутантной формой σ^{70} выделены соответствующим цветом. (Б) Совмещение кристаллической структуры CAP-зависимого ДНК-промотора (голубой) и модели трехмерной структуры 6S РНК *E. coli* (зеленая).

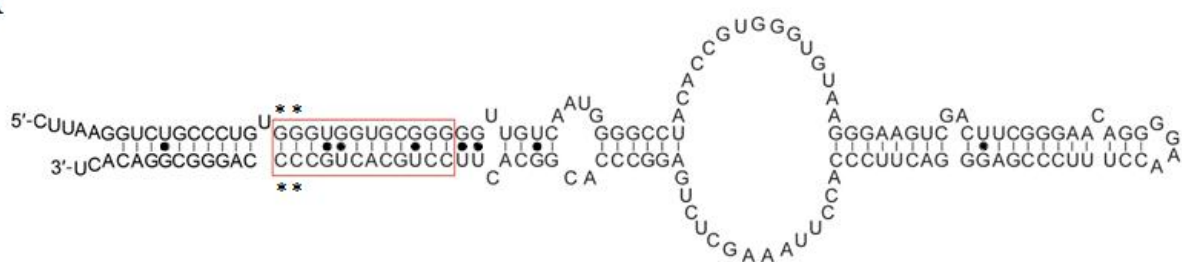
В работе [47] был проведен анализ комплексообразования мутантных форм 6S РНК, содержащих нуклеотидные замены и/или делеции в участках С85-Г88 или/и Г66-С71, с холоферментом σ^{70} -РНКП. Как оказалось, все варианты 6S РНК в значительной степени или полностью теряли сродство к РНКП. Кроме того, замены н.о. С85-Г88 и А104-

⁶«Спираль-поворот-спираль», англ. НТН (helix-turn-helix).

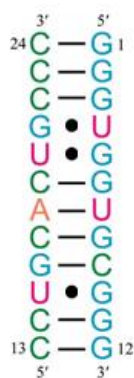
C107 (см. рис. I.10Б), не влияющие на вторичную структуру, также вызывали снижение сродства 6S РНК к РНКП, что свидетельствует о чрезвычайной важности данных районов молекулы.

Отметим, что на сегодняшний день не существует кристаллической структуры 6S РНК. Единственным успехом в данной области является получение кристаллов короткого двухцепочечного фрагмента 6S РНК из *Aquifex aeolicus*, который представляет собой продукт деградации, происходящей непосредственно при кристаллизации [50]. Природная 6S РНК *A. aeolicus* имеет длину 162 н.о. и её предполагаемая вторичная структура представлена на рис. I.12А. Для кристаллизации использовался укороченный вариант 6S РНК длиной 132 н.о., содержащий нуклеотидные замены U18G, C19G и расположенные напротив них G149C и G148C для стабилизации концов молекулы [50]. Закристаллизованный фрагмент РНК образует регулярный 12-звенный дуплекс А-формы, содержащий три неканонические пары G•U (рис. I.12Б-Г).

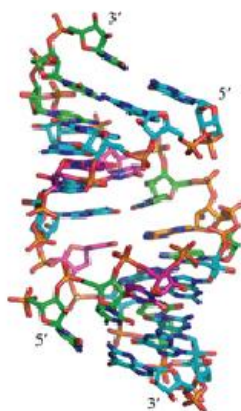
А



Б



В



Г

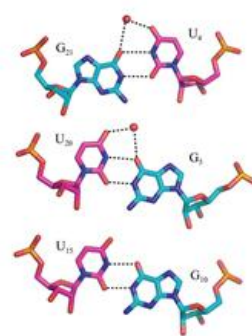


Рис. I.12. (А) Предполагаемая вторичная структура 6S РНК *A. aeolicus* [50]. Подвергнутые замене н.о. отмечены звездочкой. Закристаллизованный участок выделен красной рамкой. (Б) Схема основных комплементарных взаимодействий в закристаллизованном фрагменте РНК. (В) Кристаллическая структура РНК-дуплекса с разрешением 2,6 Å (PDB-код: 4JRT). (Г) Контакты между тремя неканоническими н.о. с участием двух молекул воды (изображены в виде красных сфер).

На основании совокупности исследований структуры и свойств 6S РНК *E. coli* и её взаимодействия с РНКП была предложена модель функционирования этой нкРНК в клетке (рис. I.13) [33].

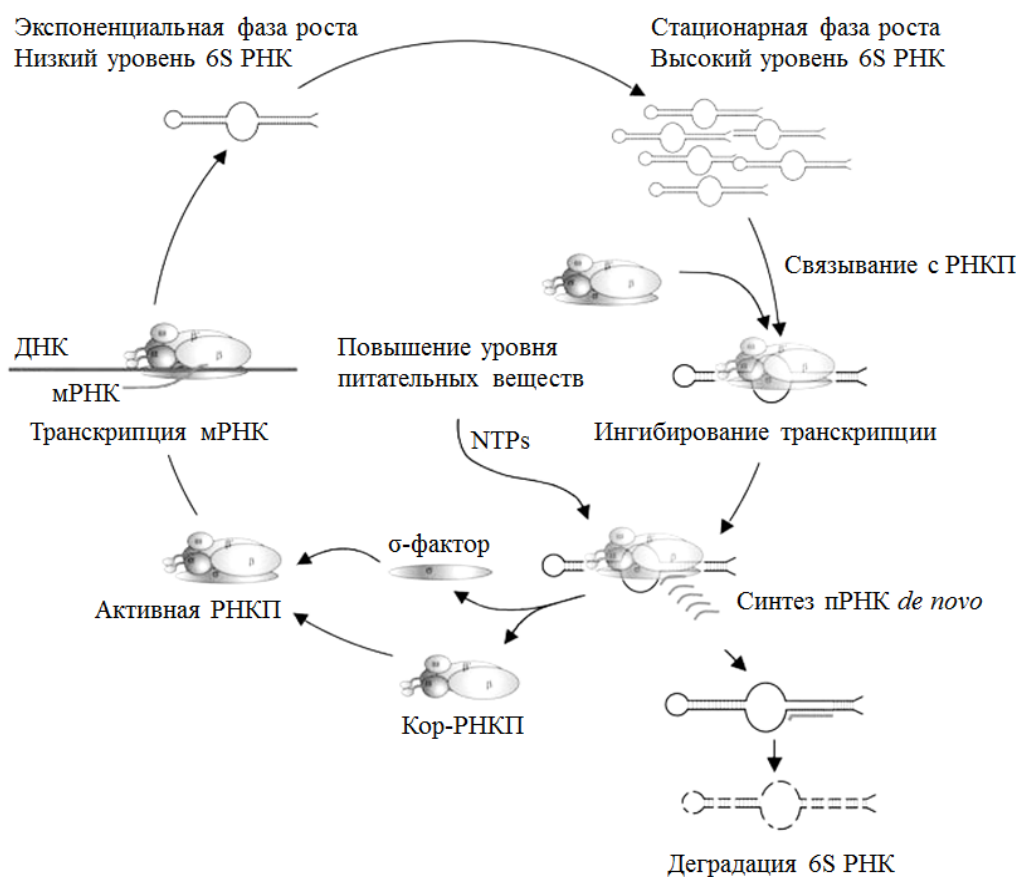


Рис. I.13. Схема функционирования 6S РНК в системе *E. coli* [33]. Транскрипция 6S РНК-зависимых генов посредством холо-РНКП (экспоненциальная фаза) ингибируется большим количеством 6S РНК в условиях недостатка питательных веществ (стационарная фаза). При возобновлении активного роста РНКП диссоциирует из комплекса с 6S РНК в результате синтеза пРНК.

6S РНК связывается с холоферментом σ^{70} -РНКП за счет структурного сходства с ДНК-промотором в «открытом» комплексе в зависимости от фазы роста клетки. В случае дефицита питательных веществ и перехода клетки в стационарную фазу роста концентрация 6S РНК возрастает, что приводит к блокированию большей части холофермента σ^{70} -РНКП. Тем не менее, комплексы РНКП со специфическими факторами транскрипции (характерными для тех или иных стрессовых условий) остаются при этом активными. Когда количество питательных веществ вновь приходит в норму, клетке необходимо восстановление нормальной транскрипционной активности. В этих условиях на матрице 6S РНК происходит синтез пРНК, которые образуют стабильный комплекс 6S РНК:пРНК. Вместе с пРНК 6S РНК покидает РНКП и подвергается деградации, позволяя ферменту вновь беспрепятственно вести транскрипцию с промоторов ДНК. Ферменты, участвующие в гидролизе 6S РНК и комплекса 6S РНК:пРНК на сегодняшний день не установлены.

1.2.3. Характеристика 6S РНК из различных бактерий

В 2005 г. в результате компьютерного анализа последовательностей нкРНК и моделирования их вторичных структур было предсказано наличие 6S РНК, гомологичных 6S РНК *E. coli.*, более чем для 100 различных видов бактерий [4]. Все обнаруженные гомологи 6S РНК имели самокомплементарные участки и с высокой степенью вероятности образовывали двухцепочечную спираль с центральным «пузырем». Таким образом, согласно проведенному исследованию практически все классы бактерий содержат как минимум один гомолог 6S РНК, однако, для некоторых бактерий предсказано наличие двух и более гомологов 6S РНК (табл. 1).

Таблица 1. Список бактериальных видов, для которых предполагается наличие нескольких гомологов 6S РНК (левый столбец), и для которых экспрессия 6S РНК подтверждена экспериментально (правый столбец).

Виды, содержащие несколько гомологов 6S РНК [4]	Виды, в которых экспрессия 6S РНК в клетке подтверждена экспериментально
<i>Bacillus subtilis</i> *	<i>Aquifex aeolicus</i> [51]
<i>Bacillus halodrans</i>	<i>Bacillus subtilis</i> * [52, 53]
<i>Clostridium acetobutilicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> [54]
<i>Legionella pneumophila</i> *	<i>Escherichia coli</i> [21]
<i>Magnetococcus sp.</i> MC-1	<i>Helicobacter pylori</i> [55]
<i>Magnetospirillum magnetotacticum sp.</i> MS-1	<i>Listeria monocytogenes</i> [56]
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Legionella pneumophila</i> * [57, 58]
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120 [59]
	<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4 [60]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [29]
	<i>Salmonella enterica</i> [61]
	<i>Shigella dysenteriae</i> [22]
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> [54]
	<i>Staphylococcus aureus</i> [62]
	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 [59]
	<i>Synecoccus sp.</i> PCC7942, PCC6301 [59, 63]

* Виды, для которых экспрессия в клетке двух различных 6S РНК подтверждена экспериментально

К сожалению, существует мало экспериментальных данных, связанных с функционированием 6S РНК в данных системах. Тем не менее, эти единичные свидетельства демонстрируют некоторые очевидные отличия в механизмах действия 6S РНК из других клеточных систем по сравнению с 6S РНК *E. coli.* Например, показано, что 6S РНК из *H. pylori* служит матрицей для синтеза двух различных вариантов пРНК, симметрично транскрибирующихся с противоположных сторон центрального «пузыря» (рис. I.14А) [55]. Предполагаемая вторичная структура 6S РНК из *Synechocystis sp.* PCC 6803 содержит дополнительную стабильную шпильку вблизи 5'-конца молекулы, которая тем не менее не препятствует специфическому синтезу пРНК длиной до 32 н.о. (рис. I.14Б).

6S РНК океанической цианобактерии *Prochlorococcus marinus* MED4 может транскрибироваться как с собственного промотора, расположенного после гена *purK*, кодирующего фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазу, так и в составе дицистронной пре-*purK*-6S РНК [60]. В первом случае образуется короткий транскрипт (220 н.о.), а во втором случае после процессинга образуется более длинный вариант 6S РНК (332 н.о.). Интересно, что дополнительный 5'-домен (1-132 н.о.), присутствующий в длинном транскрипте, может образовывать две различные стабильные конформации, одна из которых представляет собой дополнительный 6S-подобный структурный элемент с расплетенной центральной частью. Уровни экспрессии альтернативных вариантов 6S РНК *Prochlorococcus* MED4 зависят от времени суток, и достигают максимума в дневное время. Короткий транскрипт превалирует в клеточных культурах с повышенной плотностью, а более длинный вариант 6S РНК имеет два пика экспрессии – в конце лаг-фазы и во время перехода клеток в стационарную фазу роста. Изменение абсолютных значений концентраций 6S РНК в обоих случаях не превышало 3-5 раз [60].

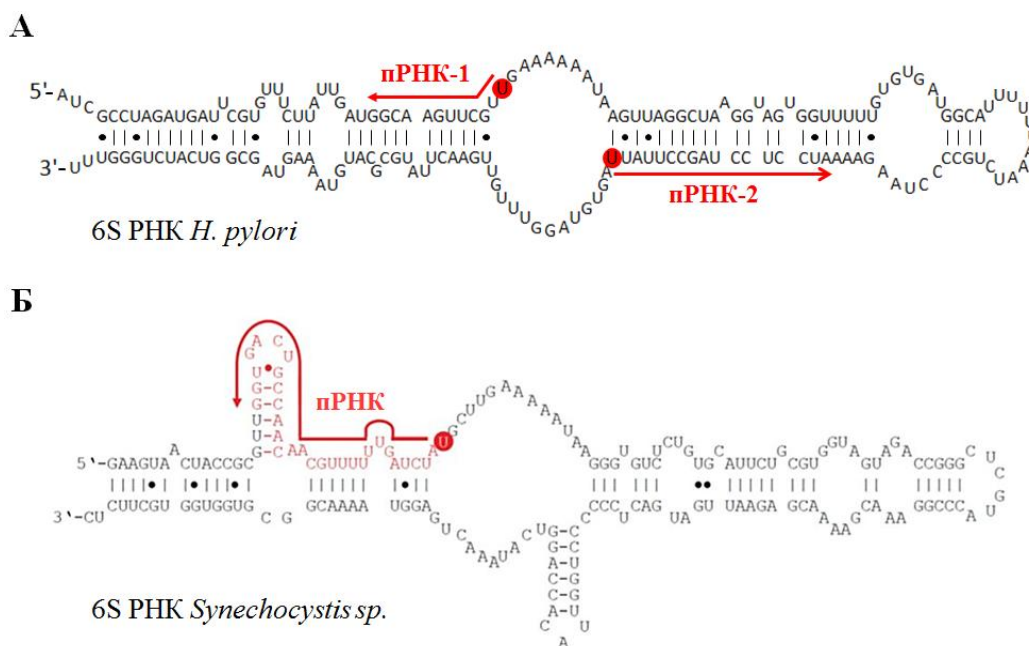


Рис. I.14. Предполагаемые вторичные структуры 6S РНК *H. pylori* (А) и 6S РНК *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Б) на основе данных химического и ферментативного пробинга [55, 59]. Красными стрелками отмечено направление синтеза пРНК, стартовый нуклеотид отмечен красным кружком.

В клетках азотфиксирующих α -протеобактерий *Sinorhizobium meliloti* и *Bradyrhizobium japonicum*, в отличие от *E. coli*, уровень транскрипции 6S РНК практически не изменяется при переходе из экспоненциальной в стационарную фазу (увеличивается максимум в 2 раза в *S. meliloti*) [54]. Экспериментально подтверждено наличие двух различных 6S РНК (6S-1 и 6S-2) в клетках грамположительной бактерии *B. subtilis* [52, 53] и грамотрицательной бактерии *L. pneumophila* [57, 58], относящихся к классу γ -протеобактерий.

I.2.3.1. Две 6S РНК *Legionella pneumophila*

6S-1 РНК из *L. pneumophila* проявляет все типичные черты 6S РНК: имеет консервативную вторичную структуру, аккумулируется главным образом в стационарной фазе роста клетки (рис. I.15) и выделяется при иммуносоосаждении вместе с РНКП [57]. Полноразмерная 6S-1 РНК имеет длину 182 н.о. Однако последние 35 н.о. с 3'-конца молекулы представляют собой последовательность, идентичную Rho-независимому терминатору транскрипции, и не влияют на функции 6S РНК. Действительно, в стационарной фазе роста клеток наблюдается появление 147-звенного продукта 3'-процессинга 6S-1 РНК, лишённого данной области (рис. I.15B).

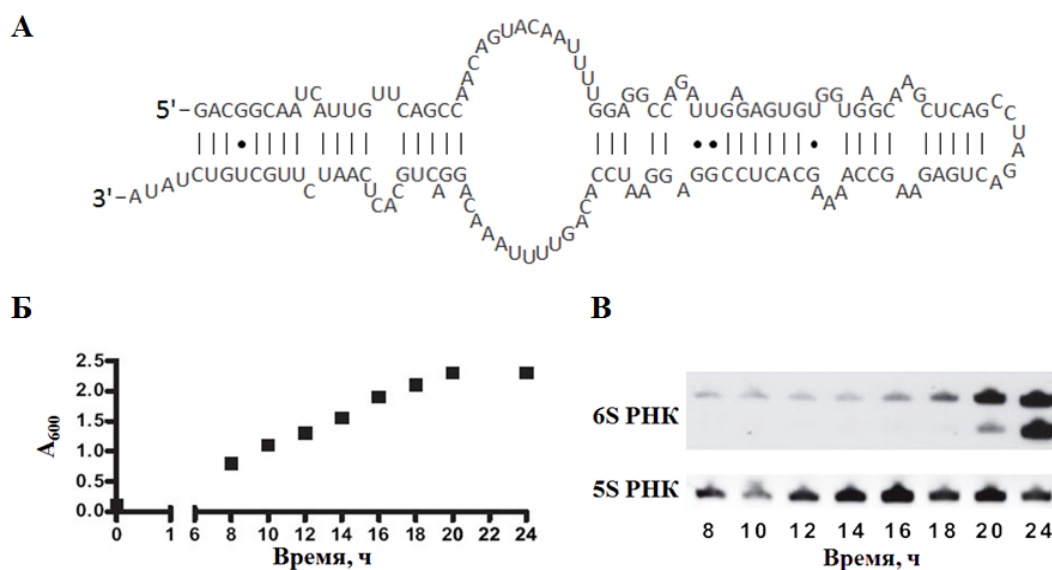


Рис. I.15. (А) Предсказанная вторичная структура 6S-1 РНК *L. pneumophila* (147 н.о.). (Б) Кривая клеточного роста *L. pneumophila* и (В) результаты блот-гибридизации общей РНК, выделенной из клеток в разные промежутки времени, с зондами к 6S-1 РНК и 5S РНК. При переходе в стационарную фазу (20 и 24 ч) наблюдается появление 147-звенного продукта гидролиза 6S-1 РНК [57].

Удаление гена *ssrS*, кодирующего 6S-1 РНК, приводит к изменению экспрессии около 135 генов, кодирующих совершенно различные белки. Экспрессия лишь 8 белков возрастала в отсутствие 6S-1 РНК. Четыре из них участвуют в метаболизме аминокислот (рис. I.16А). Для большинства генов наблюдалось ингибирование транскрипции, то есть в нормальных условиях 6S-1 РНК осуществляет прямое или косвенное стимулирование их экспрессии. Среди выявленных белков можно выделить две большие группы, ответственные за транспорт и метаболизм аминокислот. Также можно отметить белки, участвующие в процессах стрессовой адаптации, репликации и репарации ДНК (рис. I.16Б). Интересно, что нокаут 6S-1 РНК приводит к существенному уменьшению деления *L. pneumophila* в зараженных клетках человека и амёбы *Acanthamoeba castellanii*, однако не влияет на рост *L. pneumophila* в питательных средах [57].

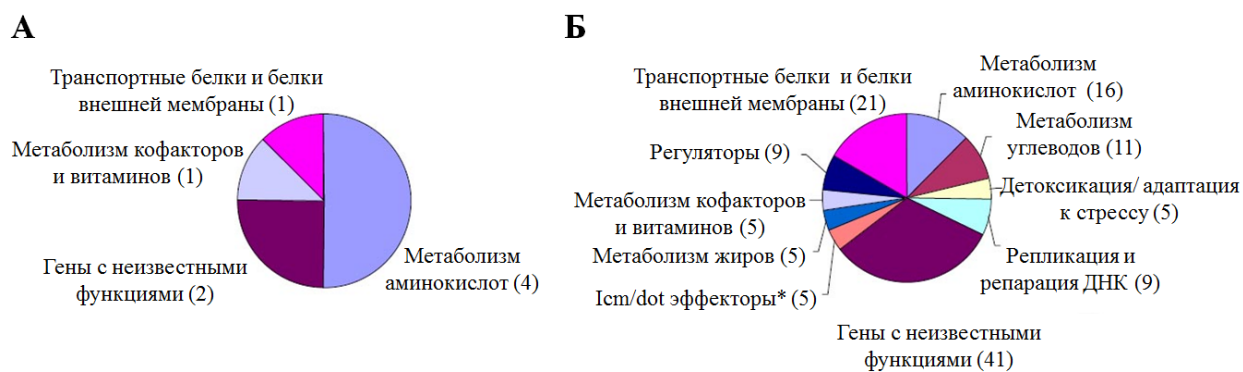


Рис. 1.16. Анализ генов, экспрессия которых подавляется (**А**) или активируется (**Б**) в клетках *L. pneumophila* посредством 6S-1 РНК [57]. Гены классифицированы на основании известных или предполагаемых функций кодируемых ими белков.

* Белки секреторной системы типа IV Icm/dot (intracellular multiplication/defective in organelle), формирующие *Legionella*-содержащую вакуоль (LCV, *Legionella* containing vacuole) в клетке-хозяине.

Таким образом, в отличие от 6S РНК *E. coli*, являющейся глобальным ингибитором транскрипции σ^{70} -зависимых промоторов в стационарной фазе, 6S-1 РНК *L. pneumophila*, наоборот, активирует экспрессию огромного количества генов. Соответственно, нельзя однозначно утверждать, что взаимодействие 6S-1 РНК *L. pneumophila* с РНКП приводит к блокированию активности последней. Кроме того, на сегодняшний момент неясно, может ли полноразмерный вариант 6S-1 РНК эффективно связывать РНКП или это является прерогативой зрелой 6S-1 РНК длиной 147 н.о.

В клетках *L. pneumophila* была также обнаружена вторая 6S РНК, экспрессирующаяся в десятки раз эффективнее, чем 6S-1 РНК [58]. В случае инфицирования *L. pneumophila* клеток *Acanthamoeba castellanii* уровень экспрессии 6S-2 РНК также был на порядок выше, чем 6S-1 РНК. Интересно, что 6S-2 РНК транскрибируется в двух вариантах с каждой из цепей гена с образованием продуктов длиной 175 (+) и 150 н.о. (-), соответственно. Транскрипция «антисмысловой» 6S-2 РНК менее эффективна, однако уровень её экспрессии меняется в зависимости от фазы роста и инфицирования клетки-хозяина, что вероятно указывают на возможную функциональную роль данного транскрипта. Принимая во внимание палиндромную частично самокомплементарную организацию любой 6S РНК, можно предположить, что и данный транскрипт имеет стабильную вторичную структуру и может связывать РНКП. Тем не менее, на сегодняшний день не существует данных о возможных функциях и свойствах как «смысловой», так и «антисмысловой» 6S-2 РНК.

1.2.3.2 Две 6S РНК *Bacillus subtilis*

В 2002 г. в двух независимых работах [52, 53] были опубликованы данные по идентификации в *B. subtilis* двух различных нкРНК, соответственно названных по аналогии с геном *ssrS* в *E. coli* – *bsrA* (6S-1) и *bsrB* (6S-2) (рис. 1.17).

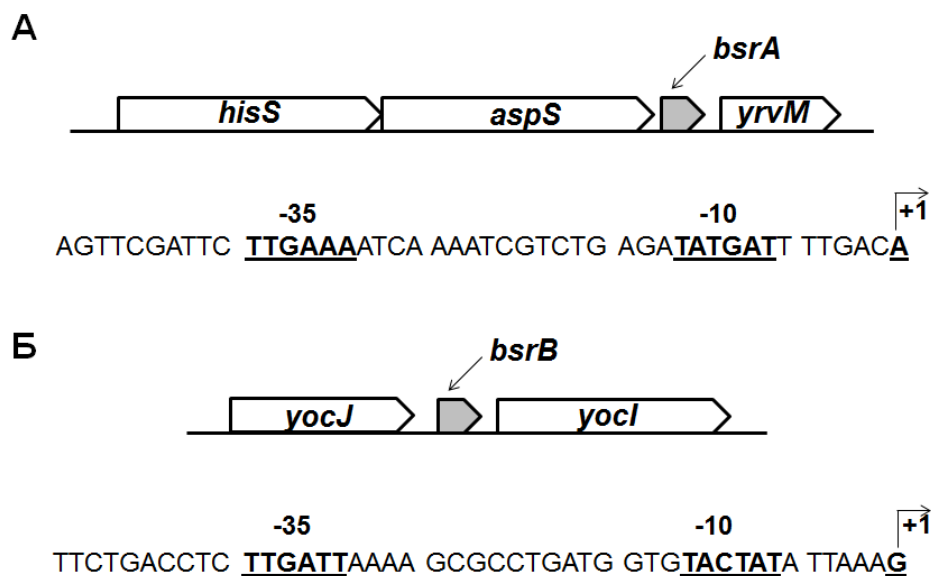
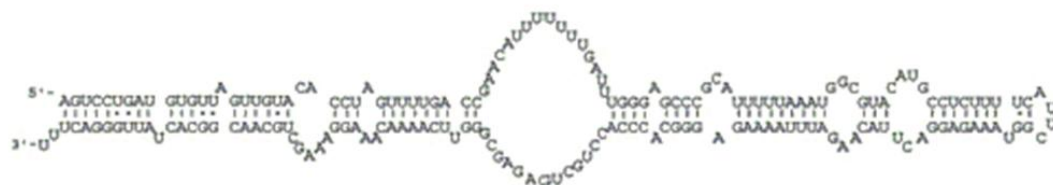


Рис. I.17. Схемы расположения генов *bsrA* (A) и *bsrB* (B) *B. subtilis* и нуклеотидные последовательности их промоторных элементов. Промоторные элементы -35 и -10 и стартовые точки транскрипции (отмечены стрелками) подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Индекс d (дезоксид) при написании последовательностей ДНК опущен.

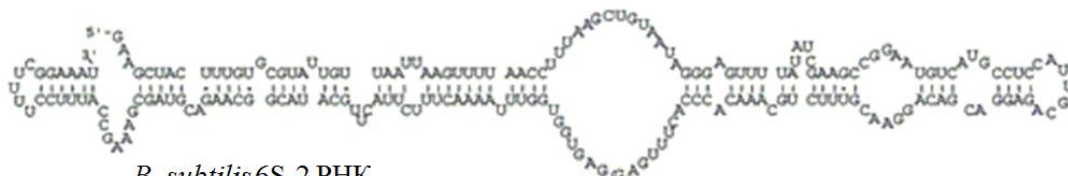
6S-1 РНК существует в клетке в виде зрелой формы длиной 190 н.о. и её прекурсора длиной 201 н.о. Нуклеазы, осуществляющие гидролиз пре-6S-1 РНК с 5'-конца пока неизвестны. 6S-2 РНК длиной 203 н.о. транскрибируется без последующего процессинга. Обе нкРНК также выделяются при иммуноосаждении с холоферментом σ^A -РНКП *B. subtilis* (σ^A является гомологом σ^{70} *E. coli*) [44]. Предсказание вторичных структур обеих 6S РНК (подтверждённое экспериментами по пробингу для 6S-1 РНК [4]) позволило утверждать, что 6S-1 и 6S-2 РНК имеют характерную 6S-подобную форму, представляющую собой протяжённую шпильку с обширным расплетённым участком в центре (рис. I.18А).

Синтез зрелой 6S-1 РНК и её предшественника возрастает с ростом клеточной культуры и достигает максимума в ранней стационарной фазе (рис. I.18Б). Пре-6S-1 РНК практически отсутствует в лаг- и ранней экспоненциальной фазах, а затем их количественное соотношение со зрелой 6S-1 РНК выравнивается. Транскрипция 6S-2 РНК наблюдается главным образом в ранней или промежуточной экспоненциальной фазах роста клеток (рис. I.18В) в зависимости от условий проведения эксперимента [53; 4]. В стационарной фазе 6S-2 РНК практически отсутствует в клетке, что совершенно не согласуется с существующей на данный момент моделью функционирования 6S РНК. Нокаут гена *bsrB* не приводил к существенным изменениям при культивации клеток, в том числе в условиях спорообразования, повышенных температур (45°C) или высокой концентрации соли (10% (m/V) NaCl) [53].

А

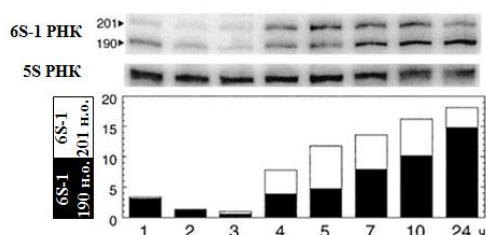


B. subtilis 6S-1 PPK



B. subtilis 6S-2 PPK

Б



В

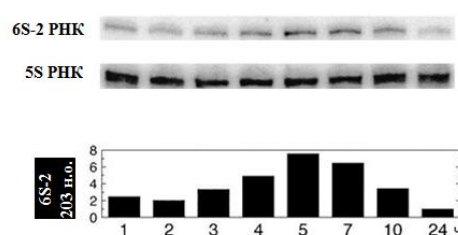


Рис. I.18. Предсказанная вторичная структура зрелой 6S-1 PPK (190 н.о.) и 6S-2 PPK (203 н.о.) *B. subtilis* [44] (А) и профили экспрессии 6S-1 PPK (Б) и 6S-2 PPK (В) *B. subtilis*, полученные при обсчете интенсивностей радиоактивных зон при Нозерн-блот-гибридизации с ³²P-меченными ДНК-зондами к 6S-1, 6S-2 или 5S PPK [4]. Для нормирования использовалась интенсивность 5S PPK в точке, соответствующей 3 ч культивирования клеток.

В работе [64] было проведено сравнение различных мутантных клеточных линий *B. subtilis* 168, содержащих как одиночные делеции генов *bsrA* (нокаут $\Delta bsrA$) или *bsrB* (нокаут $\Delta bsrB$), так и делецию обоих генов (двойной нокаут $\Delta bsrAB$). Отсутствие 6S-1 или/и 6S-2 PPK не приводили к каким-либо заметным изменениям в фенотипе мутантных клеточных линий при стандартном культивировании клеток. Единственное отличие было обнаружено при наблюдении за ростом клеток после выхода из стационарной фазы после разбавления клеточной культуры свежей питательной средой (1:500 (V/V)). Клетки, лишённые 6S-1 PPK, задерживались в лаг-фазе на 1-2 ч по сравнению с другими клеточными линиями, хотя в начале экспоненциальной фазы данная клеточная культура росла с той же скоростью и достигала тех же значений оптической плотности, что и другие линии (рис. I.19А) [64]. Такой эффект не наблюдался в случае двойного нокаута, исходя из чего авторами был сделан вывод, что именно 6S-2 PPK в отсутствие 6S-1 PPK ответственна за «опоздание» клеточного роста.

На основе клеток с одиночным нокаутом $\Delta bsrA$ и двойным нокаутом $\Delta bsrAB$ были получены линии, несущие плазмиду, в которой были закодированы, соответственно, природные гены *bsrA* и *bsrB* ($\Delta bsrA+A$ и $\Delta bsrA+B$, $\Delta bsrAB+A$ и $\Delta bsrAB+B$) или гены, содержащие мутации 6S-1 и 6S-2 PPK ($\Delta bsrA+Am$ и $\Delta bsrA+Bm$, $\Delta bsrAB+Am$ и

ΔbsrAB+Bm). Внесенные мутации полностью исключали образование центрального «пузыря» во вторичных структурах обеих 6S РНК и приводили к потере ими способности связывать РНКП.

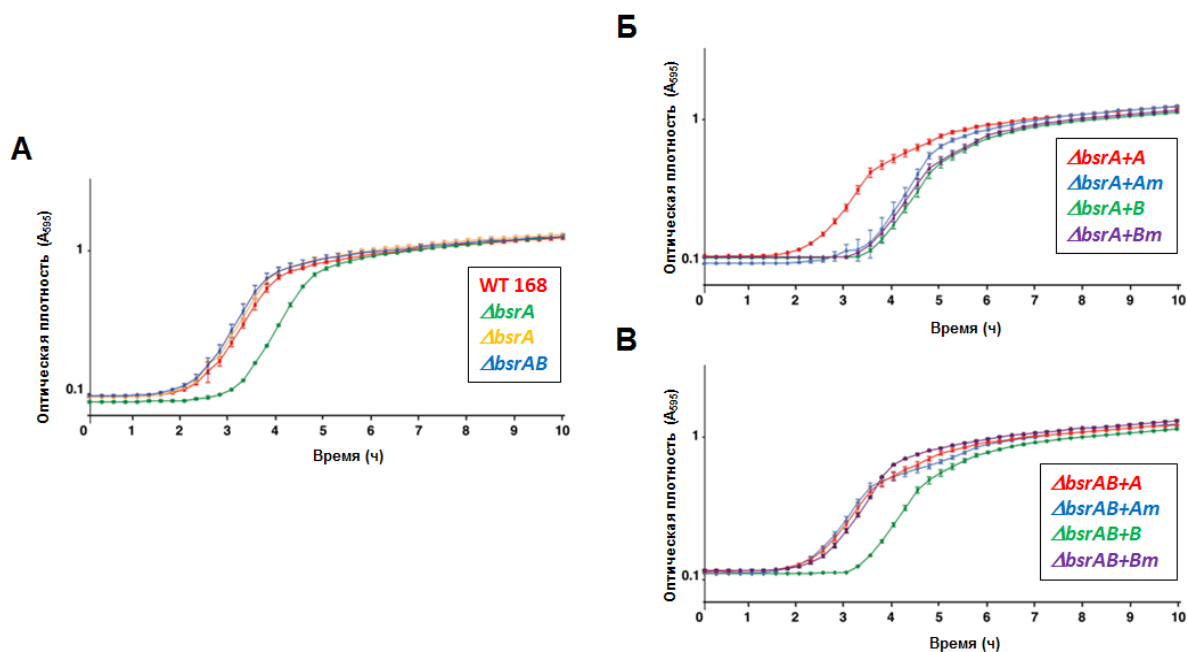


Рис. 1.19. Кривые роста различных клеточных линий *B. subtilis* после разбавления 12-часовой клеточной культуры свежей культуральной средой. (А) Сравнение кривых роста клеток дикого типа и нокаутных по генам *bsrA* или/и *bsrB* (Б) Сравнение комплементных клеточных линий, полученных на основе нокаута *ΔbsrA*. (В) Сравнение комплементных клеточных линий, полученных на основе нокаута *ΔbsrAB* [64].

Как видно из рис. 1.19Б, комплемент гена 6S-1 РНК полностью восстанавливает фенотип клеток *ΔbsrA*, тогда как другие комплементные клеточные линии по-прежнему задерживаются в лаг-фазе. С другой стороны, только комплемент гена 6S-2 РНК приводит к запаздыванию роста клеток *ΔbsrAB* (рис. 1.19В). Эти исследования указывают на определенную роль 6S-2 РНК в клетке и её непосредственную связь с 6S-1 РНК, поскольку наблюдаемые эффекты обнаружены только в тех клетках, в которых природная 6S-2 РНК оставалась единственной функционирующей 6S РНК. Стоит отметить, что нефункциональный аналог 6S-2 РНК не вызывает таких изменений фенотипа клеток (*ΔbsrA+Bm* и *ΔbsrAB+Bm*). Тем не менее, причины задержки клеток в лаг-фазе, обусловленные наличием 6S-2 РНК на фоне отсутствия 6S-1 РНК неясны.

Таким образом, конкретные функции каждой из 6S РНК в *L. pneumophila* и *B. subtilis* на данный момент неизвестны. Свойства этих 6S РНК и их участие в процессах регуляции транскрипции в случае обеих бактерий, очевидно, существенно отличаются от общепринятой модели для 6S РНК *E. coli*. Дальнейшие исследования структуры и функций 6S РНК из различных организмов позволят глубже понять истинные механизмы действия данных нкРНК и, возможно, выявить общие аспекты их функционирования в клетках.

1.3. Некодирующие РНК, регулирующие активность РНКП II в клетках эукариот

РНК-полимераза II (РНКП II) – основной фермент, отвечающий за транскрипцию в эукариотических клетках. Для образования преинициаторного комплекса РНКП (ПИК) на промоторе ДНК требуется наличие ряда основных факторов транскрипции GTF (general transcription factors), в первую очередь TBP (TFIID), TFIIB и TFIIF, а также TFIIA, TFIIN и TFIIE. Кроме того, существует огромное количество белков, активирующих или подавляющих активность РНКП, связываясь с собранным ПИК или препятствуя его правильному образованию. Однако аналогичные функции могут выполнять и малые некодирующие РНК, осуществляющие контроль над активностью ко-регуляторов транскрипции или же непосредственно РНКП, например, путем имитации функциональных элементов промотора ДНК [65]. Наиболее известными нкРНК, регулирующими транскрипцию в эукариотах за счет взаимодействия с транскрипционными факторами, являются SRA РНК, 7SK и TAR РНК, U1 мРНК, GAS5 РНК, DHFR РНК, а B1 и B2 РНК мыши и Alu РНК человека способны связываться непосредственно с РНКП (рис. 1.20).

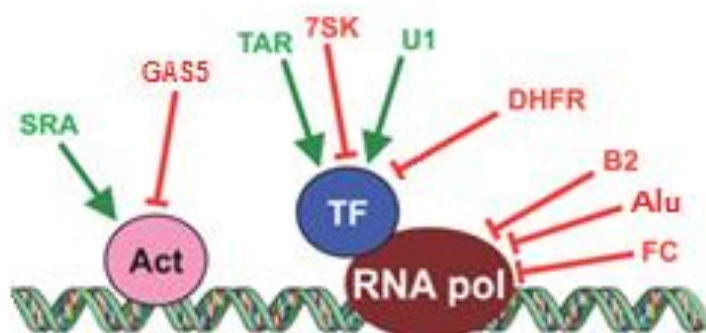


Рис. 1.20. Схема основных типов взаимодействий известных на данный момент нкРНК, модулирующих активность РНКП II и/или взаимодействующих с факторами инициации транскрипции (TF) или другими белками-активаторами РНКП II (Act). Зелеными стрелками обозначен активирующий эффект нкРНК, красными - ингибирующий эффект [2].

В качестве распространенной модели исследования РНК-связывающей активности РНКП используется FC РНК, представляющая собой синтетический аптамер.

1.3.1 FC РНК – аптамер, связывающий РНКП II

Высокоспецифичное связывание РНК-аптамеров с молекулами-мишенями широко используется в научных исследованиях, в том числе и для установления конкретных механизмов различных молекулярных процессов, происходящих в клетке. Одним из таких аптамеров является FC РНК, специфически взаимодействующая с РНКП II *Saccharomyces cerevisiae* и ингибирующая её активность [2].

FC РНК представляет собой 80-звенный олигорибонуклеотид (рис. I.21А), сконструированный в 1997 г. в научной группе проф. Сонтнэка [66]. Как было показано позднее в экспериментах по футпринтингу, функциональной частью FC РНК является 33-звенная область (FC* РНК), которая так же эффективно связывает РНКП II, как и полноразмерная РНК (K_d равны 33 и 20 нМ для FC* РНК и FC РНК, соответственно) [67], и имеет характерную вторичную структуру в виде «вилки» из двух элементов «стебель-петля». Концевые 5'- и 3'-«стебли» содержат 4 и 6 спаренных нуклеотидов, соответственно, и образуют дуплекс, имеющий А-подобную форму. Модель FC* РНК была подтверждена кристаллографическим анализом с использованием модифицированного олигорибонуклеотида, содержащего 5-бромуридин в положениях 12, 17, 27, 28 (рис. I.21Б).

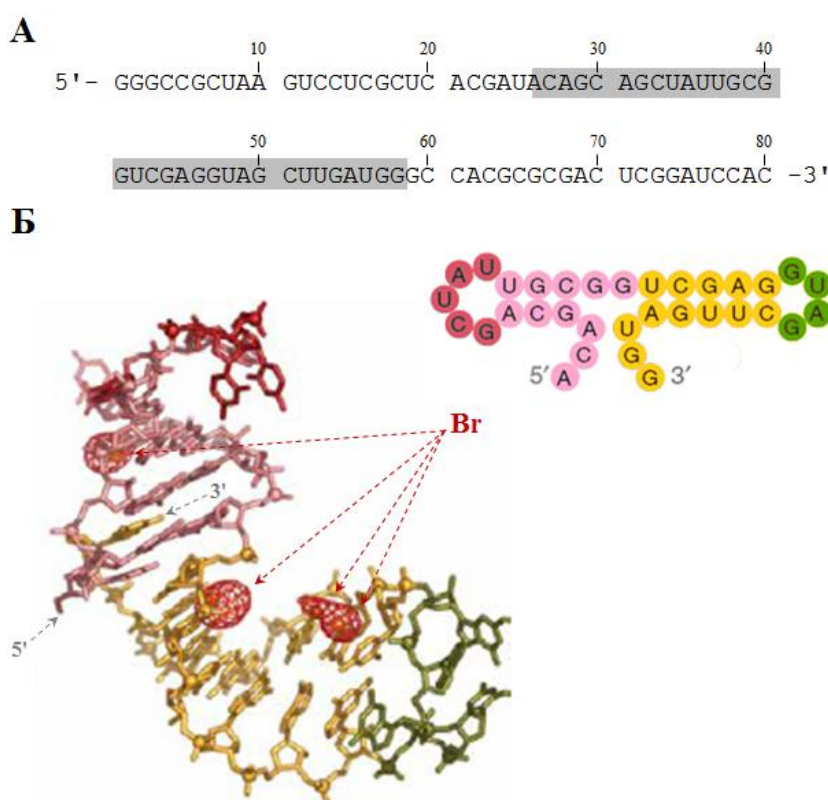


Рис. I.21. (А) Нуклеотидная последовательность FC РНК. Серым выделен функциональный участок (FC* РНК). (Б) Кристаллическая структура FC* РНК [67] и схематичное изображение структурных элементов молекулы (обозначены соответствующими цветами: 5'-«петля» – бордовым, 5'-«стебель» – розовым, 3'-«стебель» – желтым, 3'-«петля» – зеленым). Четыре атома брома изображены красными сферами.

Было показано, что FC* РНК ингибирует сборку ПИК РНКП II на промоторе ДНК, однако не связывает молекулы РНКП, вовлеченные в транскрипцию. То есть FC* РНК препятствует инициации транскрипции, но не влияет на элонгацию, поскольку не способна вытеснить ДНК из комплекса с РНКП II. Выяснение конкретного механизма взаимодействия FC* РНК с РНКП стало возможным благодаря установлению структуры данного комплекса методом РСА (рис. I.22) [67].

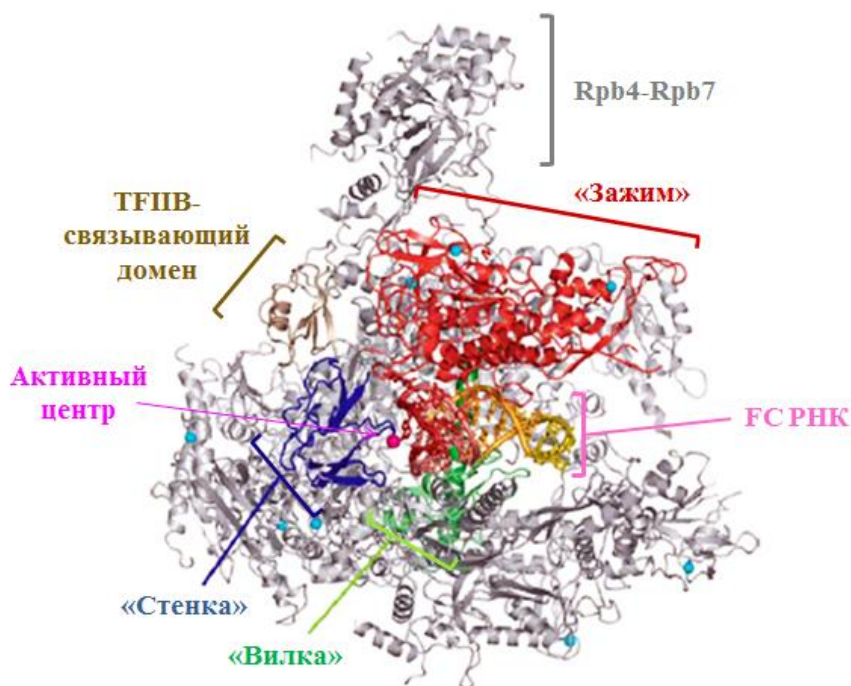


Рис. I.22. Кристаллическая структура (3,8 Å) полноразмерной 12-тисубъединичной РНКП II *S. cerevisiae* в комплексе с FC* РНК (вид сверху) [67]. Домены фермента, расположенные вблизи FC* РНК, отмечены цветами.

На основании полученных кристаллографических данных был сделан вывод, что FC* РНК связывается с РНКП II в её активном центре и взаимодействует с доменами «зажим» (clamp) и «вилка» (fork) фермента, вызывая расширение ДНК-связывающего туннеля и конформационные изменения в домене «вилка». Основные РНК-белковые контакты образуются, главным образом, с 5'-концевой шпилькой FC* РНК, в то время как 3'-конец молекулы имитирует промотор ДНК в элонгационном комплексе с РНКП II. Участки связывания этих двух НК-лигандов практически полностью перекрываются (рис. I.23А). Нуклеотидные замены и удлинение 5'-шпильки лишь незначительно снижают сродство FC* РНК к РНКП II, и только полное нарушение вторичной структуры FC* РНК делает невозможным взаимодействие этих биомолекул друг с другом.

Вопрос, на какой именно стадии сборки ПИК происходит связывание FC* РНК остается открытым, но существует гипотеза, основанная на данных РСА [67]. Инициация транскрипции на промоторе ДНК начинается с образования так называемого «закрытого» комплекса РНКП, когда один из основных транскрипционных факторов ТФIIВ образует «мост» между РНКП и ДНК над ДНК-связывающим каналом. В результате «расплавления» промотора и образования транскрипционного «пузыря» кодирующая цепь ДНК входит в ДНК-связывающий канал РНКП и образуется «открытый» комплекс (рис. I.23Б).

Сопоставление кристаллических структур комплексов РНКП-FC* РНК и РНКП-ТФIIВ показало, что FC* РНК не мешает связыванию ТФIIВ с РНКП, и, как

следствие, не препятствует образованию «закрытого» комплекса. С другой стороны, связывание FC* РНК не позволяет цепи ДНК войти в ДНК-связывающий канал и исключает возможность образования «открытого» комплекса.

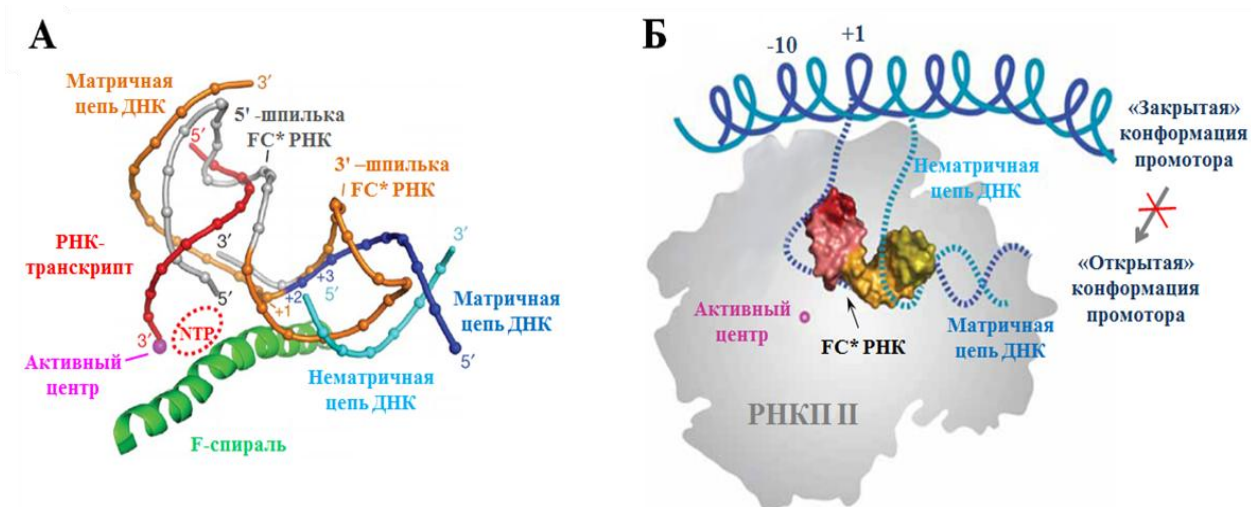


Рис. 1.23. (А) Совмещение кристаллических структур FC* РНК и промотора ДНК в элонгационном комплексе с РНКП II [68]. (Б) Взаимодействие FC* РНК с РНКП II препятствует образованию «открытого» комплекса, и тем самым ингибирует транскрипцию [67].

Таким образом, являясь на сегодняшний день единственной регуляторной нкРНК, закристаллизованной в комплексе с РНКП, FC* РНК наглядно демонстрирует вероятный механизм ингибирования транскрипции, возможно, присущий также и природным нкРНК, связывающимся с данным ферментом. Основными нкРНК, для которых показано взаимодействие с РНКП II, являются РНК, транскрибируемые с мобильных генетических элементов.

1.3.2 Регуляторные РНК, кодируемые SINE-элементами

SINE-элементы (short interspersed elements) представляют собой короткие повторяющиеся ретротранспозоны длиной от 80 до 400 нуклеотидных пар (н.п.), расположенные хаотично в геноме высших эукариот. Нуклеотидные последовательности SINEs, обладающие 65-90%-ным сходством, образуют соответствующие семейства, а число гомологичных SINE-элементов может варьироваться в пределах от 10 тысяч до миллиона копий на клетку [69]. Исторически SINE-элементы рассматривали как «генетический мусор», необходимый только для установления филогенетических связей между различными организмами и изучения видообразования млекопитающих. Однако позднее было обнаружено, что транскрипция SINE-«генов» активируется в клетках в ответ на тепловой шок или какие-либо другие стрессовые условия. Кроме того, как оказалось, SINE-элементы обладают разнообразными эволюционно важными биологическими функциями и вовлечены в процессы регуляции экспрессии генов, локализации мРНК и могут служить мобильными промоторами РНКП II [70].

На данный момент известно, что SINE-последовательности не кодируют собственные белки и транскрибируются РНКП III благодаря наличию в их 5'-концевой части промоторных элементов – так называемых А- и Б-боксов, расположенных на расстоянии 30-40 н.п. друг от друга. Таким образом, продукты транскрипции SINE-элементов – SINE РНК – можно рассматривать как нкРНК. Совершенно неожиданным стало открытие способности SINE РНК связывать РНКП II и тем самым ингибировать транскрипцию. Основные результаты в данной области получены для В1 и В2 РНК мыши и Alu РНК человека [71].

1.3.2.1 Alu РНК человека и В1 РНК мыши

Свое название SINE-элемент Alu получил благодаря тому, что содержит повторяющийся палиндромный тетра nukлеотид 5'-d(AGCT)-3', являющийся участком узнавания эндонуклеазы рестрикции из *Arthrobacter luteus* (R.AluI). В геноме человека содержится более миллиона копий Alu-последовательностей, кодирующих Alu РНК, что составляет около 10,6% ядерной ДНК. SINE-последовательности, кодирующие В1 РНК, встречаются существенно реже. Так, в клетках мыши их насчитывается не более 550 тысяч [72]. Основным сходством Alu и В1 РНК является их вторичная структура (рис. 1.24).

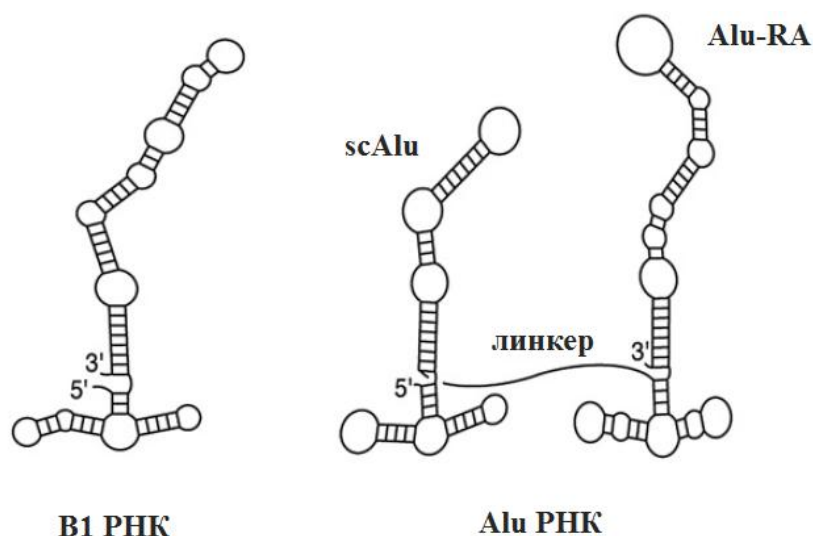


Рис. 1.24. Схематичное изображение вторичных структур В1 РНК мыши (140 н.о.) и Alu РНК человека (281 н.о.). Фрагмент Alu РНК длиной 146 н.о., известный как «правая рука», обозначен как Alu-RA [73].

Полноразмерная Alu РНК длиной около 280 н.о. представляет собой тандемный повтор двух В1-подобных элементов, соединенных 20-звенным А-богатым линкером. В клетках человека присутствует также и вторая форма Alu РНК – короткий продукт процессинга полноразмерной Alu РНК, локализованный в цитоплазме – scAlu (short cytoplasmic Alu) длиной 118 н.о., представляющий собой полный аналог В1 РНК мыши [74]. Необычное строение Alu РНК послужило причиной названия её

структурированных частей соответственно «левой» (идентичной scAlu РНК) и «правой рукой» (Alu-RA (right arm), 135-280 н.о. Alu РНК) [73]. Как Alu, так и В1 РНК способны связывать РНКП II с высокой эффективностью ($K_d \sim 3$ нМ), причем Alu РНК образует два комплекса, обладающих различной электрофоретической подвижностью в геле в неденатурирующих условиях. Тогда как связывание В1 РНК, scAlu РНК, или мутантной Alu-RA приводит к образованию только одного комплекса с РНКП II. Последующие исследования подтвердили, что каждая из «рук» Alu РНК может связывать одну молекулу РНКП со сравнимыми значениями K_d (~ 3 нМ) образующихся комплексов. Однако только полноразмерная Alu РНК и её мутантная форма, представляющая собой фрагмент Alu-RA, способны ингибировать транскрипцию *in vitro* [73]. Таким образом, Alu РНК содержит два пространственно разделенных РНКП-связывающих домена, но лишь один из них отвечает за репрессию транскрипции. Данный факт согласуется с тем, что, несмотря на высокое сродство В1 РНК мыши к РНКП II в экспериментах *in vitro*, не было зафиксировано ингибирования транскрипции [75, 76]. В то же время химерная РНК, состоящая из В1 РНК и Alu-RA демонстрирует способность подавлять активность РНКП II, сравнимую с влиянием полноразмерной Alu РНК [73].

Изучение свойств различных делеционных мутантных форм Alu РНК (рис. I.25) выявило два конкретных участка РНК, необходимых для репрессии транскрипции. В первую очередь таким участком является центральная наименее структурированная область «правой руки» Alu РНК (участок L, рис. I.25), содержащая три последовательных «петли», соединенных короткими динуклеотидными «мостиками». Наименее ожидаемым результатом оказалась необходимость наличия А-линкера для проявления способности Alu РНК ингибировать действие РНКП II. Тем не менее, только двойная мутация – одновременное удаление участка L и уменьшение длины А-линкера в два раза (удаление 10 н.о. в центре) приводило к полному исчезновению регуляторной функции полноразмерной Alu РНК.

Таким образом, можно однозначно утверждать, что Alu РНК помимо двух РНКП-связывающих доменов, расположенных в «левой» и «правой руке», имеет два различных ингибирующих домена, ответственных за функцию Alu РНК как репрессора транскрипции. Оба этих домена расположены в «правой руке» молекулы. В1 РНК и scAlu РНК, не способные ингибировать транскрипцию, имеют только РНКП-связывающий домен. Тем не менее, низкие значения констант диссоциации комплексов данных РНК с РНКП II предполагают их участие в блокировании фермента. Каким же образом в таком случае происходит транскрипция? Как оказалось, за «освобождение» РНКП II от ассоциированных с ней нкРНК отвечает фактор

транскрипции TFIIIF, связывание которого с ПИК приводит к диссоциации В1 РНК и scAlu РНК из комплекса с РНКП II, в то время как функционально активная Alu РНК, а также В2 РНК (см. раздел I.3.2.2) остаются связанными с РНКП II [77].

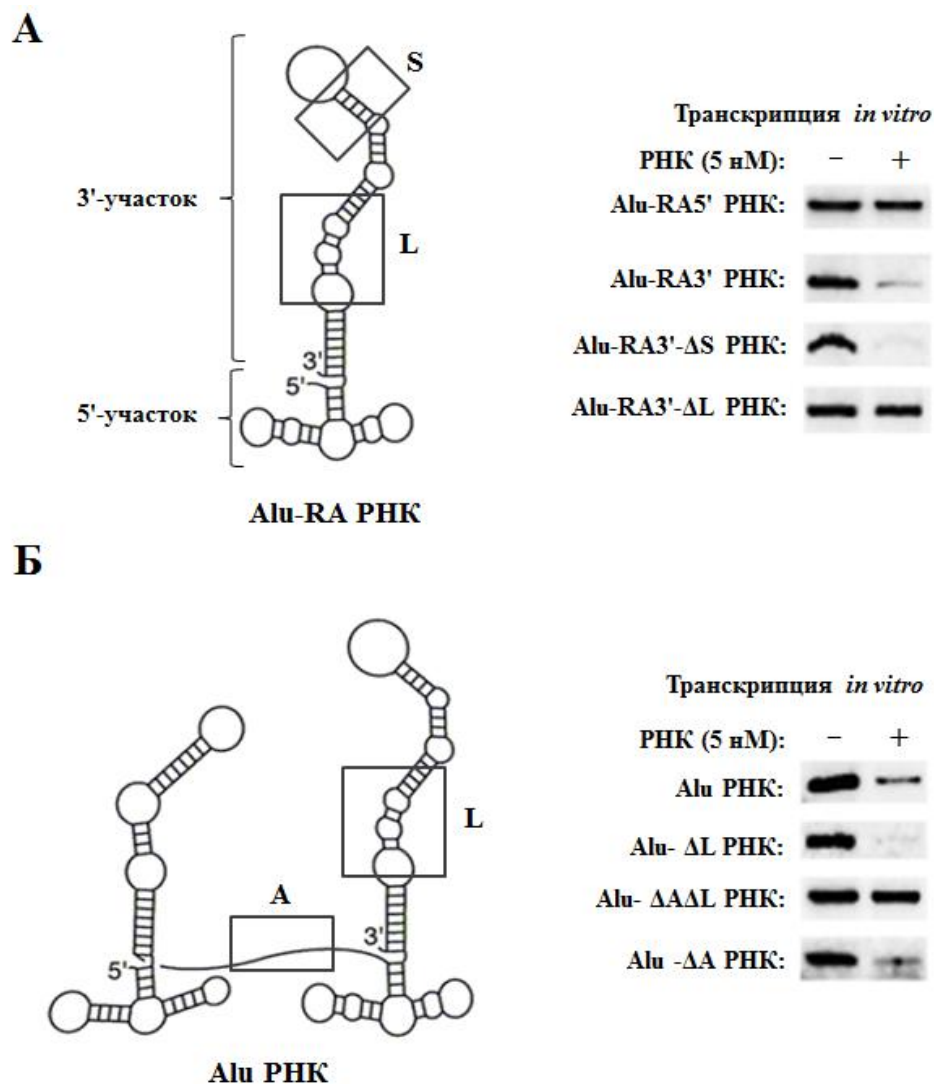


Рис. I.25. Способность делеционных мутантов Alu (А) и Alu-RA РНК (Б) ингибировать транскрипцию РНКП II *in vitro* [73].

Поскольку в условиях *in vivo* TFIIIF обычно ассоциирован с РНКП II еще до сборки ПИК на промоторе ДНК, вероятно, «бесполезное» связывание нкРНК, не регулирующих транскрипционную активность РНКП, просто не происходит. Тем не менее, точный механизм действия TFIIIF неизвестен. Связывание этого транскрипционного фактора с комплексом нкРНК:РНКП исключает его прямую конкуренцию с ДНК/РНК-лигандами. В то же время непосредственных контактов между самим TFIIIF и В1 или scAlu РНК также не было обнаружено, по крайней мере, в условиях *in vitro* [77]. Наиболее приемлемой гипотезой в данном случае является ослабление РНК-белковых контактов в результате конформационных изменений в самой РНКП, вызываемых присоединением TFIIIF.

I.3.2.2 B2 РНК мыши

B2 РНК мыши – это малая ядерная РНК длиной 178 н.о., которая отвечает за регуляцию транскрипции, осуществляемой РНКП II. Экспрессия B2 РНК в клетках грызунов, как правило, является ответом на различные стрессовые ситуации, в первую очередь на тепловой шок [78]. Также было продемонстрировано, что B2 РНК аккумулируется в клетках в ответ на УФ-облучение, обработку антибиотиком циклогексимидом или заражение вирусной инфекцией. Кроме того повышение уровня B2 РНК зафиксировано в эмбриональных и раковых клетках [79].

Было показано, что B2 РНК выделяется вместе с РНКП II при иммуносоосаждении ядерных экстрактов клеток, подвергнутых тепловому шоку [75] и способна ингибировать транскрипцию *in vitro* [76]. Эти и другие факты позволяют утверждать, что B2 РНК является эукариотическим аналогом бактериальной 6S РНК, регулирующей транскрипцию за счет непосредственного связывания с РНКП (см. раздел I.2).

Ген B2 РНК транскрибируется с помощью РНКП III и закодирован в составе B2 SINE-элементов. Точное количество SINE-последовательностей, кодирующих ген B2 РНК, на данный момент неизвестно и оценивается в ~ 350000 копий на клетку [69]. Консервативная последовательность гена B2 РНК имеет длину ~ 180 н.п. и содержит в 5'-области так называемые А- и Б-боксы, гомологичные промоторным элементам РНКП III. На 3'-конце B2 РНК расположен терминатор транскрипции РНКП III, а также три перекрывающиеся последовательности 5'-d(AATAAA)-3', являющиеся сигналами полиаденилирования. Транскрипция данного SINE-элемента требует наличия факторов TFIIIB и TFIIIC. Было показано, что в клетках присутствуют по крайней мере четыре формы B2-транскриптов различной длины: ~ 150, ~ 180, ~ 240 и ~ 500 н.о. Две, наиболее протяженные из них (~ 240 и ~ 500 н.о.), полиаденилированы и являются весьма стабильными ($\tau_{1/2} = 60$ мин), тогда как время деградации на 50% полноразмерного транскрипта (180 н.о.) составляет всего 3-4 мин. 150-Звенный вариант B2 РНК более устойчив и характеризуется значением $\tau_{1/2}$ порядка 20 мин [80].

Вторичная структура B2 РНК была впервые определена в 2004 г. научной группой проф. Гудрича [76]. Она может быть условно разделена на три части (рис. I.26): (1) протяженный двухцепочечный участок (1-72 н.о.), содержащий расплетенный фрагмент в центре, (2) слабо структурированный участок (73-153 н.о.), содержащий три небольшие шпильки и (3) короткую неструктурированную А/Т-богатую область (154-178 н.о.), консервативную для всех SINE-элементов [69].

Позднее теми же авторами [79] методом футпринтинга с использованием различных рибонуклеаз было установлено, что РНКП II связывается главным образом с

3'-областью В2 РНК (73-153 н.о.). С помощью анализа делеционных мутантов был определен участок в В2 РНК длиной 51 н.о. (81-131 н.о.), который связывается с РНКП II и ингибирует транскрипцию *in vitro* с такой же эффективностью, что и полноразмерная В2 РНК. Данная область состоит из 18-звенного одноцепочечного участка (SS2) (рис. I.26), фланкированного двумя шпильчными структурами (S4/L4 и S5/L5). При удалении шпильки S4/L4 оставшийся фрагмент В2 РНК (99-131 н.о.) по-прежнему специфически связывался с РНКП II, однако терял способность к ингибированию транскрипции.

Было показано, что оба функциональных фрагмента В2 РНК (81-131 н.о. и 99-131 н.о.) образуют РНК-белковые контакты с РНКП II при сборке ПИК на промоторе ДНК, но только 51-звенный участок (81-131 н.о.) блокирует сборку элонгационного комплекса. Данный факт свидетельствует о том, что белок содержит два различных центра связывания: активный центр, блокирование которого приводит к глобальному ингибированию синтеза мРНК, и дополнительный («docking») центр, высокоспецифичный к некодирующим РНК. Вместе с тем, наличие 5'-области В2 РНК (1-80 н.о.) не является обязательным для связывания молекулы с РНКП II или репрессии транскрипции.

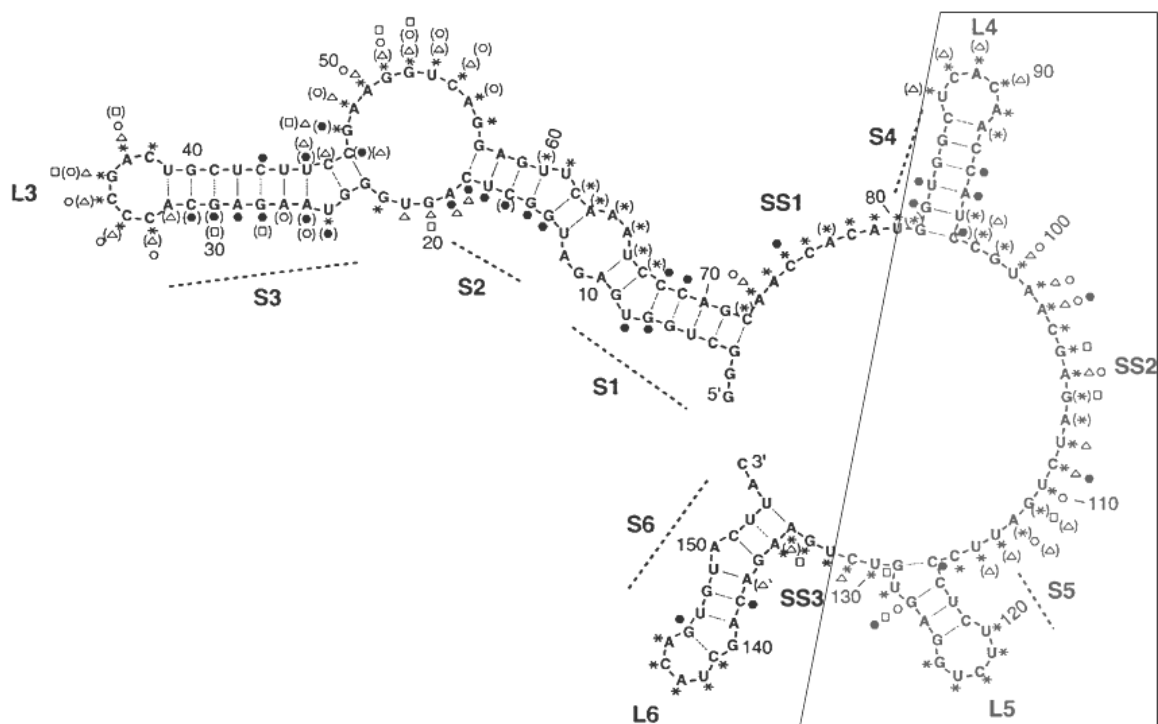


Рис. I.26. Предполагаемая вторичная структура В2 РНК (1-155 н.о.) на основе данных химического и ферментативного пробинга [79]. Отмечены н.о., гидролизующиеся при действии $MgCl_2$ (*), РНКазы V1 (●), РНКазы I (Δ), РНКазы T2 (○), РНКазы T1 (□). Неструктурированный 3'-концевой участок (154-178 н.о.) опущен. Рамкой выделена функциональная часть В2 РНК (81 – 131 н.о.).

Предполагают, что механизм взаимодействия В2 РНК с РНКП II может быть аналогичен соответствующему для FC РНК (раздел I.3.1) или бактериальной 6S РНК (раздел I.2) с РНКП несмотря на то, что вторичные структуры этих РНК существенно отличаются от РНКП-связывающей области В2 РНК. Тем не менее, K_d комплексов В2 РНК с РНКП II мыши и FC РНК с дрожжевой РНКП II равны (~ 30 нМ), а избыток одной РНК может эффективно вытеснять другую из её комплекса с РНКП [67].

Методом «торможения в геле» с одновременным использованием флуоресцентно-меченного фрагмента ДНК, содержащего промотор AdMLP (основной поздний промотор аденовируса), и ^{32}P -меченной В2 РНК было показано, что оба лиганда входят в состав ПИК РНКП II и мигрируют в геле совместно, несмотря на частичное вытеснение ДНК-промотора избытком В2 РНК (рис. I.27). Данный комплекс характеризуется большей подвижностью в агарозном геле, чем ПИК РНКП II с промотором AdMLP, и образуется только при долговременном присутствии В2 РНК в реакционной смеси. Вероятно, наличие В2 РНК повышает отрицательный заряд комплекса, или в данном случае имеет место конформационные изменения в ПИК. Так же нельзя исключить, что В2 РНК может способствовать высвобождению определенной субъединицы полимеразы из ПИК. Отсутствие хотя бы одного из трех транскрипционных факторов ТВР, ТFIIB и ТFIIF предотвращает образование подобных комплексов, а обработка ПИК, содержащего В2 РНК, рибонуклеазами, приводящая к гидролизу В2 РНК, «возвращает» подвижность в геле оставшегося комплекса РНКП II с промотором ДНК до первоначального уровня [76].

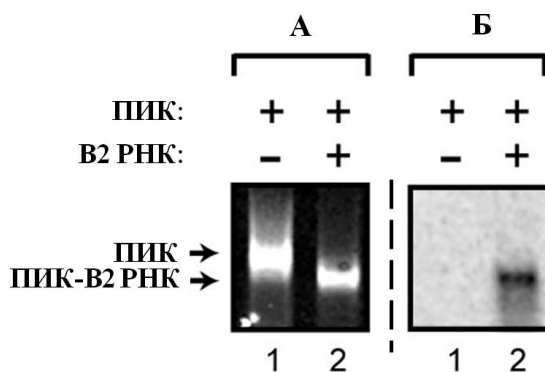


Рис. I.27. В2 РНК связывает ПИК РНКП II на промоторе AdMLP с образованием комплексов, характеризующихся большей подвижностью в геле в неденатурирующих условиях. Формирование ПИК происходило с флуоресцентно меченной (Alexa Fluor 647) 60-звенной ДНК, содержащей промотор AdMLP, в отсутствие и присутствии ^{32}P -меченой В2 РНК. (А) Фотография геля под УФ-светом, (Б) радиоавтограф геля [76].

Таким образом, В2 РНК ингибирует транскрипцию после образования стабильного комплекса РНКП с промотором ДНК, но до начала синтеза РНК, то есть влияет главным образом на стадию инициации транскрипции. Стоит отметить, что наличие В2 РНК в ПИК предотвращает не только полноразмерную транскрипцию мРНК, но и препятствует синтезу abortивных продуктов. Строго говоря, в эксперименте *in vitro* в присутствии

В2 РНК была показана возможность однораундового синтеза РНКП II тринуклеотида, однако образовавшийся комплекс был не способен ни к абортивному высвобождению синтезированной РНК, ни к переходу в стадию элонгации [76].

Было высказано предположение, что В2 РНК предотвращает «плавление» промотора и блокирует возможность образования «открытого» комплекса, либо не позволяет нуклеозидтрифосфатам связываться в активном центре РНКП II [76]. Анализ данных по кросслинкингу и футпринтингу ПИК, связанного с В2 РНК, показал, что В2 РНК мешает образованию контактов между РНКП II и промотором, хотя и не препятствует взаимодействию факторов ТВР и ТFIIB с ДНК. При обработке В2 РНК в составе ПИК РНКазой I все нарушенные контакты восстанавливаются. Таким образом, согласно существующей на данный момент модели В2 РНК не разрушает ПИК, но мешает правильной координации промотора ДНК в активном центре РНК-полимеразы, тем самым переводя ПИК в инертную форму. По сути В2 РНК меняет конформацию «закрытого» комплекса РНК-полимеразы и препятствует его переходу в «открытый» и, тем более, в инициаторный комплексы (рис. 1.28). Следует отметить, что, несмотря на отсутствие в данном случае важнейших контактов между РНКП и ДНК, фермент и все ассоциированные с ним факторы остаются связанными с промотором. Данный факт можно частично объяснить присутствием в ПИК факторов транскрипции, которые обеспечивают наличие большого числа дополнительных взаимодействий, удерживающих мультибелковый комплекс на ДНК.

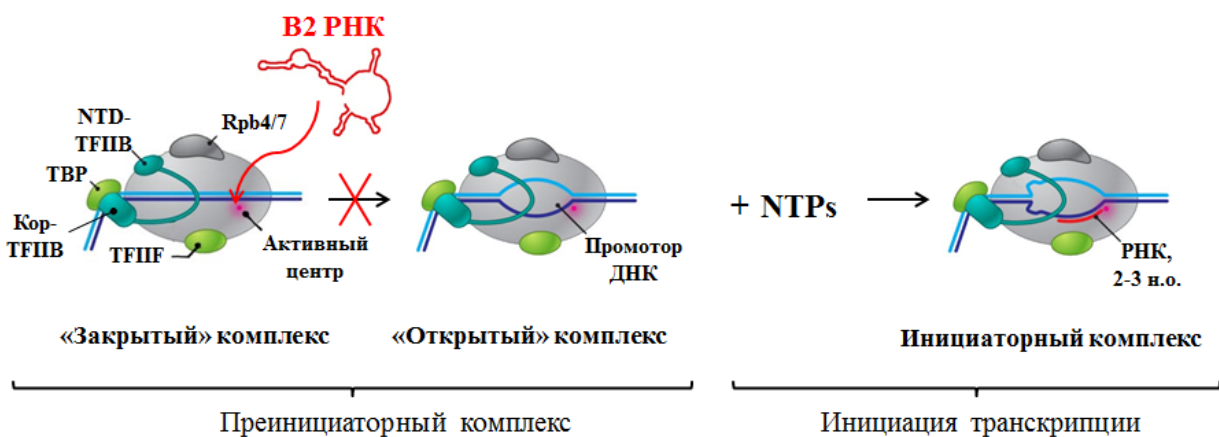


Рис. 1.28. Схема молекулярной организации ПИК РНКП II на промоторе ДНК [81]. В2 РНК изменяет конформацию «закрытого» комплекса РНКП II посредством связывания вблизи активного центра фермента, блокирует возможность образования «открытого» комплекса и, как следствие, препятствует инициации транскрипции.

Ранее упоминалось, что В2 РНК играет важную роль в репрессии генов мРНК при осуществлении ответной реакции в первую очередь на тепловой шок [75]. Экспериментально подтверждено влияние В2 РНК мыши на экспрессию актина и гексокиназы II. При трансфекции клеток антисенсовыми к данной РНК

олигонуклеотидами происходило заметное уменьшение репрессии транскрипции соответствующих генов. Однако должен существовать и механизм, позволяющий белкам теплового шока (например, HSP70), экспрессироваться в присутствии В2 РНК. Также остается неизвестным, как проходит снятие репрессии после того, как клетки восстанавливаются после теплового шока.

В ряде статей в экспериментах *in vitro* было показано, что ингибирование транскрипции, вызванное В2 РНК, является обратимым процессом [76, 82]. В связи с этим предполагается, что в клетках существует специальный фактор: РНКаза, хеликаза, другая регуляторная нкРНК или специальный белок, который связывается с В2 РНК, вытесняя ее из комплекса с полимеразой. В случае белков теплового шока вероятно наличие специального фактора транскрипции, специфичного к их генам, который напрямую может предотвращать ингибирующий эффект В2 РНК. Одним из наиболее распространенных факторов такого типа является транскрипционный активатор HSF, который связывается с промоторами генов, кодирующих белки теплового шока, и стимулирует их транскрипцию. Однако попытки зафиксировать взаимодействия между HSF и В2 РНК не привели к успеху.

В разделе I.3.2.1 была охарактеризована В1 РНК мыши, связывающая РНКП II, но не препятствующая ее функционированию из-за отсутствия конкуренции с ДНК-промотором. В работе [76] было продемонстрировано, что В1 и В2 РНК имеют сравнимую степень сродства к ферменту. Позднее было установлено, что обе РНК конкурируют друг с другом за связывание с активным центром РНКП II и вытесняют друг друга из комплекса с белком [77]. Возникает закономерный вопрос – способна ли В1 РНК препятствовать функционированию В2 РНК? В экспериментах *in vitro* было показано, что В2 может ингибировать транскрипцию даже в том случае, когда РНК предварительно связан с В1 РНК [77]. Проводя аналогии между В1 РНК и scAlu РНК (раздел I.3.2.1), можно предположить, что данные нкРНК могут быть вовлечены в механизмы «снятия» эффекта ингибирования при определенных условиях путем замены активных ингибиторов В2 и Alu РНК на их нефункциональные аналоги.

Удивительно, что помимо непосредственного блокирования РНКП II, В2 РНК также участвует в дополнительных процессах, контролирующих протекание транскрипции [82]. Так, например, В2 РНК в комплексе с РНКП II специфически ингибирует фосфорилирование остатков серина Ser2 и Ser5 в большой субъединице РНКП II (Rpb1), осуществляемое фактором транскрипции ТФIIH, проявляющим киназную и хеликазную активности. Данные остатки серина входят в состав гептапептидных повторов YSPTSPS, встречающихся с частотой около 26 раз в С-концевом домене (CTD)

Rpb1, и узнаются после фосфорилирования различными белками, выполняющими ко-транскрипционный процессинг мРНК или модифицирование гистонов. Процесс фосфорилирования напрямую связан с активностью РНКП II: CTD Rpb1 в инициаторном комплексе с РНКП не фосфорилирован, в то время как его гиперфосфорилирование наблюдается при элонгации транскрипции. Замена как Ser2, так и Ser5 на Ala или Glu в каждом гептапептидном повторе приводит к гибели дрожжевых клеток [83].

Поскольку в обычных условиях Ser2 фосфорилируется после Ser5, достаточно было изучить наличие или отсутствие в составе Rpb1 фосфорилированной формы (Ser-P) только Ser5. С помощью метода иммуноферментного анализа в варианте Вестерн с использованием различных антител было показано, что содержание Ser5-P в Rpb1 в составе ПИК на актиновых промоторах резко сокращается в условиях теплового шока, несмотря на присутствие в ПИК активного ТФIIH. С учетом того, что уровень ТФIIH в клетках после теплового шока практически не уменьшается, полагают, что ингибируется сама киназная активность ТФIIH. Тем не менее, это происходит только в том случае, когда полимеразы, связанная с В2 РНК, находится на промоторе ДНК и только тогда, когда В2 РНК добавлена в реакцию перед образованием «закрытого» комплекса. Деградикация В2 РНК с помощью РНКаз приводит к восстановлению фосфорилирующей активности ТФIIH. Исходя из этих фактов можно сделать вывод, что сам фактор ТФIIH не является мишенью для связывания В2 РНК, и репрессия его активности является результатом взаимодействия В2 РНК непосредственно с РНКП II.

Еще одной неожиданной особенностью В2 РНК явилась её способность к собственной элонгации в комплексе с РНКП II [84]. Несмотря на то, что большинство РНК-полимераз являются ДНК-зависимыми (за исключением РНКП ретровирусов), в литературе описан ряд случаев синтеза РНК на РНК-матрице. Например, как было рассмотрено в разделе I.2, бактериальная РНКП синтезирует короткие транскрипты длиной до 30 н.о., комплементарные 6S РНК [3]. Дрожжевая РНКП II способна специфически удлинять свободные 3'-концы РНК в РНК-дуплексах, используя комплементарную цепь в качестве матрицы [68]. Кроме того, данный механизм используется вирусом гепатита δ , а также виридами растений, в геноме которых не закодирована РНК-зависимая РНК-полимераза, однако их РНК реплицируется в клетках хозяев [85].

В работе [84] был проведен ряд экспериментов, в которых ПИК РНКП II, связанный с 5'-[32 P]-меченной В2 РНК, обрабатывали клеточными экстрактами в присутствии смеси нуклеозидтрифосфатов. Это вызывало заметное уменьшение интенсивности наблюдаемого комплекса РНКП II с В2 РНК, причем отсутствие в

реакционной смеси любого из нуклеозидтрифосфатов не приводило к диссоциации В2 РНК. Отсутствие клеточного экстракта также не влияло на степень комплексообразования В2 РНК с РНКП II. Это свидетельствует о том, что процесс диссоциации В2 РНК из комплекса с ферментом связан с транскрипционной активностью РНКП, которая возможна только в присутствии одного или нескольких факторов, содержащихся в клеточных экстрактах. Полное «выключение» транскрибирующей активности РНКП II при обработке клеток мыши α -аманитином⁷, приводило к возрастанию концентрации свободной В2 РНК. При аналогичной обработке клеток актиномицином-D⁸, который «выключает» только ДНК-зависимый синтез РНК, обнаружили увеличение длины одной части молекул В2 РНК и ее последующую деградацию, другая же часть молекул В2 РНК оставалась связанной с РНКП и не подвергалась элонгации. В работе [84] также была установлена точная последовательность синтезируемого РНКП II *de novo* дополнительного фрагмента В2 РНК. Как оказалось, этот участок длиной 18 н.о., самокомплементарен 3'-концу молекулы В2 РНК (рис. I.29), и, по всей видимости, образует с В2 РНК протяженную стабильную шпильку, несомненно влияющую на конформацию В2 РНК и её взаимодействие с РНКП II.

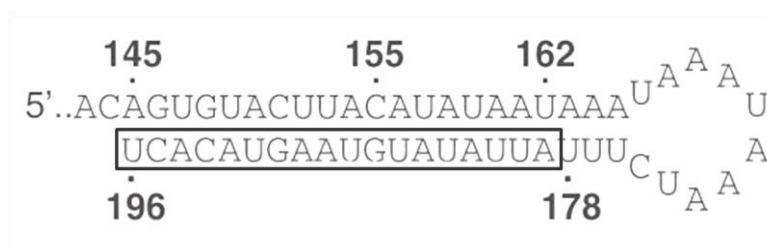


Рис. I.29. Фрагмент В2 РНК (143-178 н.о.). Участок длиной 18 н.о. (выделен рамкой), синтезирующийся *de novo* при связывании В2 РНК с ПИК, полностью комплементарен участку В2 РНК (145-162 н.о.) [84].

На основе проведенных экспериментов был сделан вывод, что процесс удлинения В2 РНК в комплексе с РНКП II действительно приводит к его дестабилизации, и является, как минимум, одним из путей, позволяющих «снять» эффект ингибирования транскрипции. Точный механизм данного процесса, а также конкретный фактор или факторы, инициирующие элонгацию В2 РНК, пока неизвестны. Однако на основе данных компьютерного моделирования можно предположить, что удлинение цепи В2 РНК, как и любой другой РНК, находящейся в активном центре полимеразы, приводит к частичному открытию домена «зажим» РНКП и, как следствие, ослаблению связывания лиганда в комплексе с ферментом (рис. I.30).

⁷ α -Аманитин – циклический октапептид; токсин, выделяемый из грибов рода *Amanita*, чрезвычайно сильный ингибитор транскрипции специфичный к РНКП II.

⁸ Актиномицин-D – токсичный антибиотик пептидной природы, синтезируемый бактерией *Streptomyces parvullum*, специфически ингибирует процесс транскрипции РНК в эукариотах.

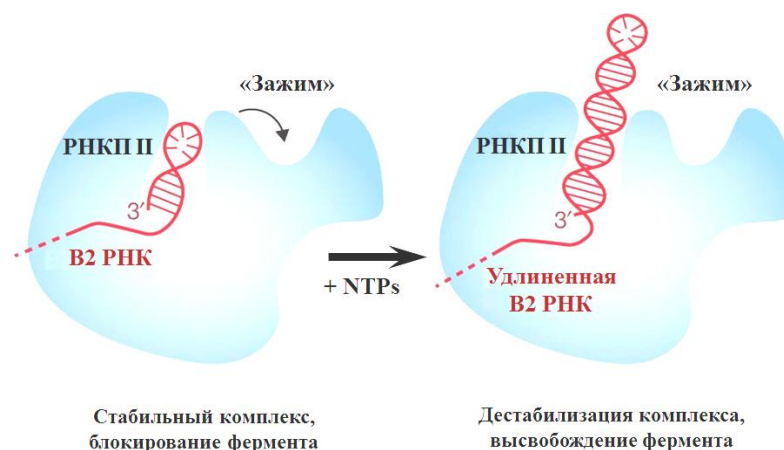


Рис. I.30. Удлинение B2 РНК в активном центре РНКП II, приводящее к стерическим препятствиям, дестабилизирующим комплекс B2 РНК – РНКП II.

Аналогичный процесс наблюдается и в случае бактериальной РНКП [3] (раздел I.2). Таким образом, обнаруженные механизмы регуляции транскрипции посредством РНК могут свидетельствовать в пользу одной из современных гипотез, согласно которой РНК-полимеразы эволюционно произошли от древних РНК-репликаз [68].

1.3.3. Некоторые некодирующие РНК, регулирующие транскрипцию при взаимодействии с транскрипционными факторами

1.3.3.1. 7SK и TAR РНК

Впервые малая ядерная 7SK РНК длиной 330-332 н.о. была обнаружена в 1976 г. [86]. Спустя 25 лет было установлено, что она является ключевым компонентом 7SK малого ядерного рибонуклеопротеида (7SK мяРНП), который в свою очередь взаимодействует с мультибелковым фактором элонгации транскрипции P-TEFb (positive transcription elongation factor b) и ингибирует его активность [87, 88]. P-TEFb человека состоит из циклин-зависимой киназы 9 (CDK9) и циклина T1 (CycT1) или одной из двух альтернативных форм циклина T2 (CycT2a или CycT2b). Данный фактор требуется для перехода РНКП II, «приостановленной» на промоторе (так называемые паузы транскрипции) в стадию активной элонгации (рис. I.31).

Как упоминалось выше (раздел I.3.2.2), активность РНКП II напрямую связана с фосфорилированием остатков серина Ser2 и Ser5 в гептапептидных повторах YSPTSPS С-концевом домене (CTD) большой субъединицы РНКП II – Rpb1. В составе ПИК CTD Rpb1 немодифицирован. Его частичное фосфорилирование (в первую очередь Ser5) осуществляет фактор транскрипции ТФИИ. В результате РНКП II покидает промотор и начинает транскрипцию. После синтеза короткой цепи мРНК наступает пауза транскрипции. РНКП II останавливается на небольшом расстоянии от инициаторного нуклеотида, и с ней связываются отрицательные элонгационные факторы NELF (negative

elongation factor) и DSIF (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor). Эта пауза необходима для привлечения белков, осуществляющих 5'-кэпирование растущей цепи мРНК. Для продолжения транскрипции необходимо гиперфосфорилирование CTD Rpb1 по остаткам Ser2, которое и обеспечивает P-TEFb. Однако наиболее важной функцией P-TEFb является модификация NELF и DSIF. Фосфорилирование DSIF превращает его в положительный элонгационный фактор, а фосфорилированная форма NELF диссоциирует из транскрипционного комплекса, позволяя РНКП II вести эффективную элонгацию и синтезировать полноразмерные мРНК [89].

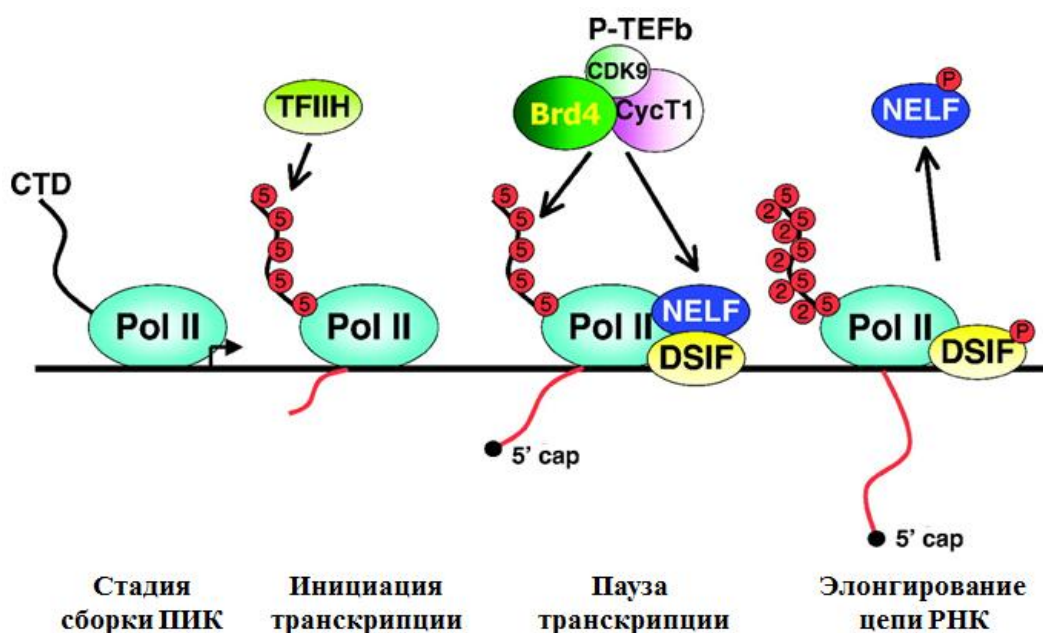


Рис. I.31. Схема основных стадий транскрипции, осуществляемой РНКП II [89].

Привлечение P-TEFb осуществляется благодаря различным ДНК-связывающим факторам, в том числе белку Brd4 (bromodomain-containing protein 4) (рис. I.31) [90]. В отсутствие P-TEFb РНКП II способна синтезировать только короткие 5'-концевые последовательности пре-мРНК [91]. Таким образом, P-TEFb необходим для синтеза большинства клеточных мРНК, и его ингибирование посредством взаимодействия с 7SK мяРНК является важным регуляторным механизмом экспрессии генов в клетках эукариот.

Нуклеотидная последовательность 7SK мяРНК консервативна среди геномов позвоночных. Так, например, последовательности 7SK мяРНК мыши и человека идентичны на 98% [92]. Хотя в геноме человека закодированы сотни псевдогенов 7SK мяРНК, транскрипция данной РНК осуществляется РНКП III только с единственного «истинного» гена, расположенного в шестой хромосоме. Как правило, в клетке содержится в среднем 200000 копий 7SK мяРНК [93].

Как и все РНК, синтезированные с помощью РНКП III, 3'-конец 7SK мяРНК человека длиной 332 н.о. содержит U-богатую последовательность 5'-UCUUUU-3', которая связывается с белком La (*lupus*⁹ *antigen*), защищающим растущую цепь РНК от деградации и способствующим формированию правильной вторичной структуры [94]. В процессе посттранскрипционной модификации нуклеазы отщепляют от 7SK РНК 3'-концевые 1-3 н.о., а затем происходит аденилирование, приводящее к существованию в клетке трех различных вариантов 7SK мяРНК, содержащих на 3'-конце последовательности 5'-UCUA-3', 5'-UCUUA-3' или 5'-UCUUUA-3', соответственно. Таким образом, длина стабильных вариантов 7SK мяРНК варьируется в пределах 330-332 н.о., однако наиболее устойчивой является 331-звенная РНК [95]. Вскоре после синтеза 7SK мяРНК белок La заменяется родственным белком LARP7 (*La-related protein 7*) массой 67 кДа, содержащим один LAM-мотив (*lupus antigen motif*) на N-конце молекулы (37-111 а.о.). Интересной особенностью 7SK мяРНК является её кэпирование с 5'-конца, не характерное для подавляющего большинства других транскриптов, синтезированных РНКП III. В результате 5'-концевой гуанозин молекулы монометируется по γ -фосфатной группе. К настоящему времени аналогичный процесс описан в литературе только для U6 мяРНК [96]. В обоих случаях метилирование осуществляет S-аденозинметионин-зависимая метилтрансфераза MePCE.

Примерно 90% 7SK мяРНК в клетке связано с белками LARP7 и MePCE в составе так называемого «ядра» белково-нуклеинового комплекса 7SK мяРНК. Нокдауны генов, кодирующих MePCE или LARP7, приводят к быстрой деградации данной РНК [95]. Однако основными белками, связывающими 7SK мяРНК, являются HEXIM и P-TEFb. Белок HEXIM¹⁰ существует в виде двух паралогов HEXIM1 и HEXIM2, которые экспрессируются с соседних генов человеческой хромосомы 17 и состоят из 359 и 286 а.о., соответственно. С-Концевые домены обоих вариантов белка HEXIM могут взаимодействовать непосредственно друг с другом, образуя, соответственно, гетеро- или гомодимеры. При нокдауне гена, кодирующего HEXIM1, 7SK мяРНК связывается с HEXIM2 без потери функций. Тем не менее, уровни экспрессии HEXIM1 и HEXIM2 существенно различаются в разных тканях. HEXIM в форме димера связывается с 7SK мяРНК, после чего происходит изменение конформации белка, позволяющее ему взаимодействовать с CDK9 P-TEFb [95].

⁹ *System lupus erythematosus* – системная красная волчанка, аутоиммунное заболевание, при котором вырабатываются антитела к высококонсервативному РНК-связывающему белку La.

¹⁰ HEXIM – от англ. «hexamethylene-bis-acetamide induced mRNA». Индукция экспрессии данного белка была обнаружена при обработке клеток гладкой мускулатуры человека N,N'-гексаметилен-бис-ацетамидом [97].

Предполагаемая вторичная структура 7SK мРНК приведена на рис. I.32А, Б и содержит две ярко выраженные шпильки М3 (24-87 н.о.) и М8 (301-326 н.о.), связывающиеся, соответственно, с белками HEXIM и LARP3. Концевые 3'- и 5'- области молекулы соединены за счет комплементарных взаимодействий и образуют стабильный двухцепочечный участок М1. Субъединица Р-TEFb СусТ1 также связывается 3'-концевой областью 7SK мРНК (в районе участка М8), и, более того, образует специфические белок-белковые контакты с С-концевым доменом LARP3, по крайней мере в условиях *in vitro* [98]. В то же время CDK9 взаимодействует с HEXIM, ассоциированным 5'-концевой областью 7SK мРНК. Полностью собранный 7SK мРНК, состоящий из 7SK РНК и белков LARP7, MePCE, Р-TEFb и димера HEXIM1/2, имеет массу 550-600 кДа (рис. I.32В).

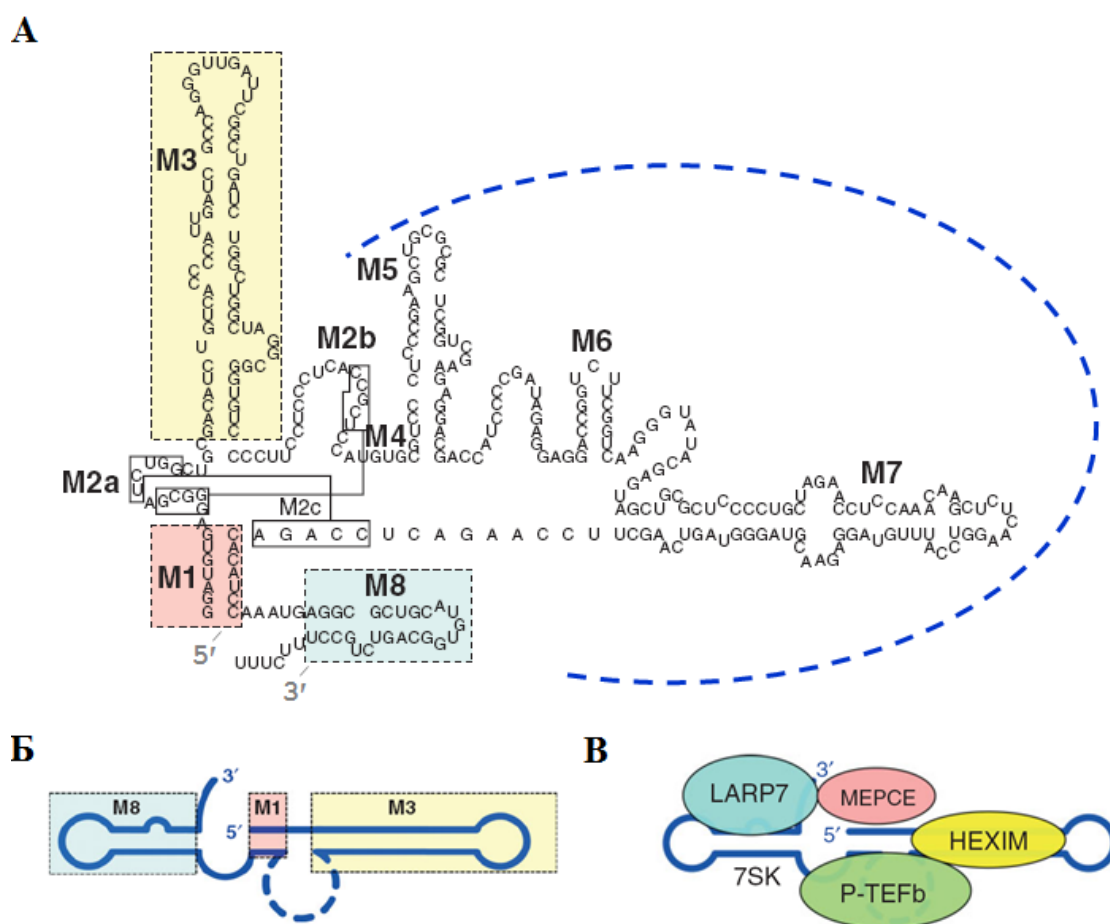


Рис. I.32. (А) Вторичная структура 7SK мРНК человека на основе данных химического и ферментативного пробинга, а также данных компьютерного моделирования. Структурные мотивы обозначены как М1-М8, синей пунктирной линией выделена наименее структурированная область молекулы. (Б) Упрощенная схема вторичной структуры 7SK мРНК. (В) Схематичное изображение 7SK мРНК в комплексе с белками, образующими 7SK мРНК [95].

7SK мРНК ингибирует транскрипционную и киназную активность фактора Р-TEFb и не позволяет обеспечивать элонгацию транскрипции. Тем самым достигается эффективное снижение уровня синтеза мРНК в клетке. Интересно, что только

активированная форма Р-TEFb (с фосфорилированной по T186 CDK9) может взаимодействовать с 7SK мяРНП [91]. Однако не весь Р-TEFb оказывается связанным с 7SK мяРНП. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в клеточном ядре свободная и связанная формы Р-TEFb находятся в постоянно поддерживаемом равновесии, контролируемом с помощью различных сигнальных механизмов [99]. При необходимости Р-TEFb и HEXIM диссоциируют из комплекса с 7SK мяРНК, и последняя связывается с рядом гетерогенных ядерных рибонуклеопротеидов (hnRNP), включая hnRNPA1, hnRNPA2, hnRNPQ1 и hnRNPR, а также с РНК-хеликазой А (RHA). HnRNP взаимодействуют с областями M1 и M7 (hnRNPQ1, hnRNPR) или только с M7 (hnRNPA1 и hnRNPA2) в 7SK мяРНК и не позволяют ей вновь связаться с Р-TEFb. Отметим, что LARP7 и MePCE остаются связанными с 7SK мяРНК. В определенных условиях может происходить и обратный процесс – диссоциация hnRNP и последующее связывание Р-TEFb [100].

С другой стороны, высвобождение Р-TEFb из комплекса 7SK мяРНП может служить сигналом для клеточного роста и пролиферации клеток. Для репликации ВИЧ также требуется Р-TEFb и, по всей видимости, 7SK мяРНП обеспечивает «молчание» и/или изменение уровня экспрессии вирусных генов в инфицированной клетке. Р-TEFb оказывает влияние также на многие воспалительные и аутоиммунные заболевания, стероид-зависимые виды рака, лейкемию, лимфому и многие другие [95].

На сегодняшний день точные механизмы и конкретные условия, влияющие на равновесие между связанной и свободной формами Р-TEFb, неизвестны. Однако было показано, что облучение клеток УФ-светом, а также ингибирование транскрипции с помощью актиномицина-D или ингибиторов Р-TEFb (флавопиридол, росковитин), приводят к его диссоциации из комплекса с 7SK мяРНП. Аналогичный эффект оказывают ингибиторы деацетилаз гистонов – гексаметилен-бис-ацетамид (HMBA) и N-гидрокси-N'-фенилдиамид октандиовой кислоты (SANA¹¹) [95]. Тем не менее, в литературе описан целый ряд белков-активаторов Р-TEFb, вероятно препятствующих связыванию Р-TEFb с 7SK мяРНП. Например, белок Brd4 (см. рис. I.31) непосредственно взаимодействует с ацилированными гистонами H3 и H4, а также связывается с СусТ1 Р-TEFb, удерживая тем самым фактор элонгации на хроматине во время митоза. Brd4 также может связывать Р-TEFb в комплексе с 7SK мяРНП и инициировать изменение конформации СусТ1 и диссоциацию CDK9 [89].

¹¹ SANA – от англ. «*suberoylanilide hydroxamic acid*», применяется в качестве противоопухолевого препарата под коммерческим названием «Вориноостат».

Интересный механизм диссоциации Р-TEFb из комплекса 75K мяРНП описан в случае клеток, зараженных ВИЧ-1 (далее ВИЧ). Транскрипция вирусной ДНК, встроенной в геном клетки-хозяина, активируется с 5'-концевого вирусного промотора (5'-LTR, long terminal repeat) непосредственно за счет привлечения Р-TEFb. Это осуществляет небольшой (86-101 а.о.) регуляторный белок ВИЧ – Tat (trans-activator of transcription), который на порядки увеличивает эффективность синтеза вирусной РНК главным образом на стадии элонгации транскрипции. В отсутствие Tat РНКП II не способна синтезировать с 5'-LTR транскрипты длиной более 60-80 н.о. Tat также привлекает к промотору и другие транскрипционные факторы: SWI/SNF, р300/CBP, PCAF, hGCN5, ТВР и ТFIIB, обеспечивая тем самым быструю сборку активного ПИК [101]. Кроме того Tat связывается с 5'-концом растущей цепи вирусной РНК – так называемым TAR-(transactivation response)-элементом длиной 59 н.о., образующим стабильную шпильку. Данное взаимодействие обусловлено специфическими контактами между аргинин-богатым участком в Tat и тринуклеотидной боковой петлей 5'-UCU-3' в TAR РНК [100]. Данный комплекс связывает Р-TEFb за счет РНК-белковых контактов между апикальной петлей TAR РНК и СусТ1, а также белок-белковых контактов между Tat и СусТ1 (рис. I.33А). Формирование тройного комплекса Tat–TAR–Р-TEFb регулируется набором ферментов, осуществляющих ацетилирование, фосфорилирование, метилирование и убиквитинилирование Tat [101].

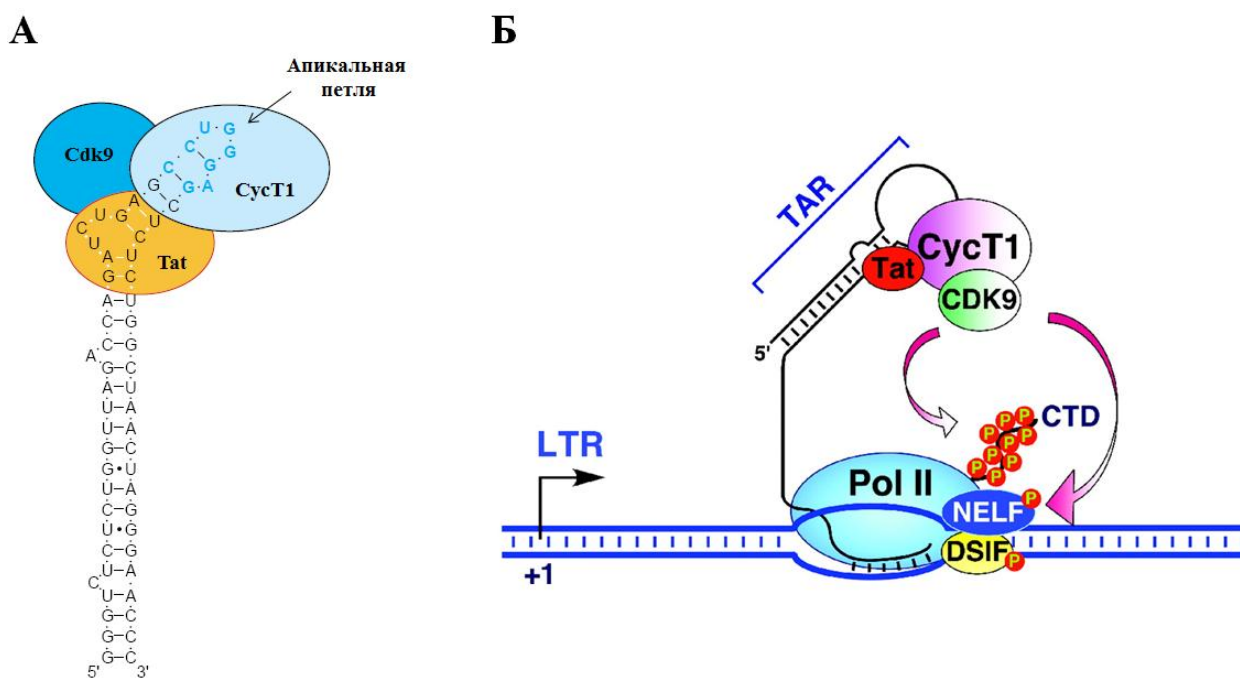


Рис. I.33. Активация транскрипции 5'-LTR ВИЧ с помощью TAR РНК. (А) Вторичная структура TAR РНК, участки узнавания белков Tat и СусТ1 отмечены оранжевым и голубым кружками, соответственно [102]. (Б) Схема активации РНКП II на LTR-промоторе ВИЧ с участием комплекса белка Tat и TAR РНК [89].

Привлекая P-TEFb на вирусный промотор, Tat и TAR РНК обеспечивают гиперфосфорилирование РНКП II и, как следствие, элонгацию транскрипции (рис. I.33Б). Интересно, что образование комплекса Tat-TAR-CuT1 меняет субстратную специфичность CDK9, обычно метилирующего только остатки Ser2 гептапептидных повторов CTD Rpb1 РНКП II. Изменения конформации киназы, вызванные связыванием Tat и TAR РНК, приводят к фосфорилированию как Ser2, так и Ser5 [103], что позволяет активировать элонгацию транскрипции даже без привлечения TFIIH.

Вторичная структура TAR РНК в районе апикальной петли и фланкирующего её участка имитирует 3'-концевую шпильку 7SK мяРНК (М3 на рис. I.33Б), что позволяет ей связывать HEXIM1 и в отсутствие Tat не допускать активации P-TEFb [95]. Однако помимо обычной конкуренции между комплексом Tat-TAR РНК и 7SK мяРНК за связывание с P-TEFb, Tat может вытеснять фактор элонгации из его комплекса с 7SK мяРНК [104]. По всей вероятности это происходит благодаря непосредственному взаимодействию Tat с CuT1 и изменению конформации P-TEFb [105, 106].

Последние исследования в этой области позволили идентифицировать клеточные белки, действующие аналогично Tat ВИЧ. Такими факторами являются SRSF1 и SRSF2 (SR-splicing factor 1/2), относящиеся к семейству РНК-связывающих белков SR12 и вовлеченные в процессы сплайсинга и метаболизма РНК в клетках млекопитающих [99]. Каждый из двух белков выделяется при иммуноосаждении с 7SK мяРНК и взаимодействует со шпилькой М3 7SK мяРНК. Несмотря на то, что роль каждого из белков SRSF на данный момент неизвестна, в случае SRSF2 удалось однозначно установить его функцию как активатора транскрипции в системе, содержащей РНК-последовательность ESE (exonic-splicing enhancer), закодированную вблизи промотора активируемого гена. Таким образом, регуляция элонгации транскрипции, осуществляемая P-TEFb находится в тесной координации с ко-транскрипционным сплайсингом, в частности за счет белковых факторов, выполняющих различные функции [99].

I.3.3.2. SRA РНК

SRA РНК (steroid receptor activator) человека – одна из первых некодирующих РНК, для которых было показано участие в процессах регуляции транскрипции. Впервые SRA РНК была выделена в группе проф. О'Мэлли в 1999 г. [107] в составе комплекса с SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) – транскрипционным ко-активатором белковой природы, регулирующим транскрипцию промоторов, осуществляемую РНКП II. Позднее

¹² SR-белки содержат консервативный домен с протяженными повторами остатков серина (S) и аргинина (R).

было установлено, что SRA РНК связывается не с самим SRC-1, а с ассоциированными с ним РНК-хеликазами p68 или p72¹³, также участвующими в активации эстрогенных рецепторов [108]. SRA РНК взаимодействует и со многими другими белковыми факторами – ко-активаторами или ко-репрессорами ядерных рецепторов, важнейшими из которых являются CTCF¹⁴, SLIRP (SRA stem-loop interacting RNA-binding protein) и SHARP (SMRT/HDAC1-associated repressor protein) [109]. Суперэкспрессия SRA РНК приводит к активации транскрипции посредством стероидных рецепторов, в то время как нокадаун гена SRA РНК приводит к подавлению активности андрогенных рецепторов в раковых клетках простаты [110]. Можно сказать, что SRA РНК выступает в роли своеобразной платформы для связывания (в том числе и конкурентного) различных белков, выполняющих те или иные функции в регуляции ко-активации ядерных рецепторов, и прямо и/или косвенно является активатором транскрипции. Отметим, что SRA РНК присутствует во всех тканях человека, однако более высокий уровень этой РНК наблюдался в тканях печени, сердца и в скелетных мышцах [111]. Еще одной установленной функцией SRA РНК является косвенная модуляция активности транскрипционного фактора MyoD, играющего ключевую роль при дифференциации мышечных клеток [112].

Ген *SRA1*, кодирующий SRA РНК, характеризуется высокой консервативностью среди геномов мыши, крысы и человека и состоит из 5 экзонов. Длина преобладающих транскриптов составляет 700-850 н.о., хотя были зафиксированы и более протяженные РНК длиной 1300-1500 н.о. [111]. По меньшей мере, 20 различных изоформ SRA РНК были обнаружены в клетках человека, однако с использованием филогенетических и термодинамических методов удалось идентифицировать топологически консервативный кор-домен длиной 687 н.о., который содержится во всех видах транскриптов и соответствует экзонам 2-5. Данный кор-домен SRA РНК содержит набор шпилечных структур – структурных элементов STR (рис. I.34).

В ходе анализа делеционных форм SRA РНК не удалось выявить конкретные участки молекулы, ответственные за её связывание с теми или иными белками – по всей видимости, основные взаимодействия осуществляются именно благодаря мультиплетной структуре РНК. Тем не менее, точечные нуклеотидные замены в участках STR1, STR7, STR9, STR10, STR11 и STR12 влияли на активность SRA РНК [113]. Отметим, что остаток U207 в STR5 является сайтом псевдоуридинирования [114] чрезвычайно важным для

¹³ РНК-хеликазы p68 и p72 – так называемые «DEAD-box» белки, содержащие консервативный мотив Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD).

¹⁴ Фактор транскрипции, участвующий в процессах реорганизации хроматина. В геноме человека около 20% участков связывания CTCF d(5'-CCCTC-3'/3'-GGGAG-5') ассоциированы с хеликазой p68 [109].

функционирования SRA РНК. Модификацию осуществляют псевдоуридинсинтазы Pus1p и Pus3p, также являющиеся ко-активаторами ядерных рецепторов [115]. Интересно, что замена U207A приводит к радикальным изменениям специфичности SRA РНК и превращает её в основной репрессор ядерных рецепторов.

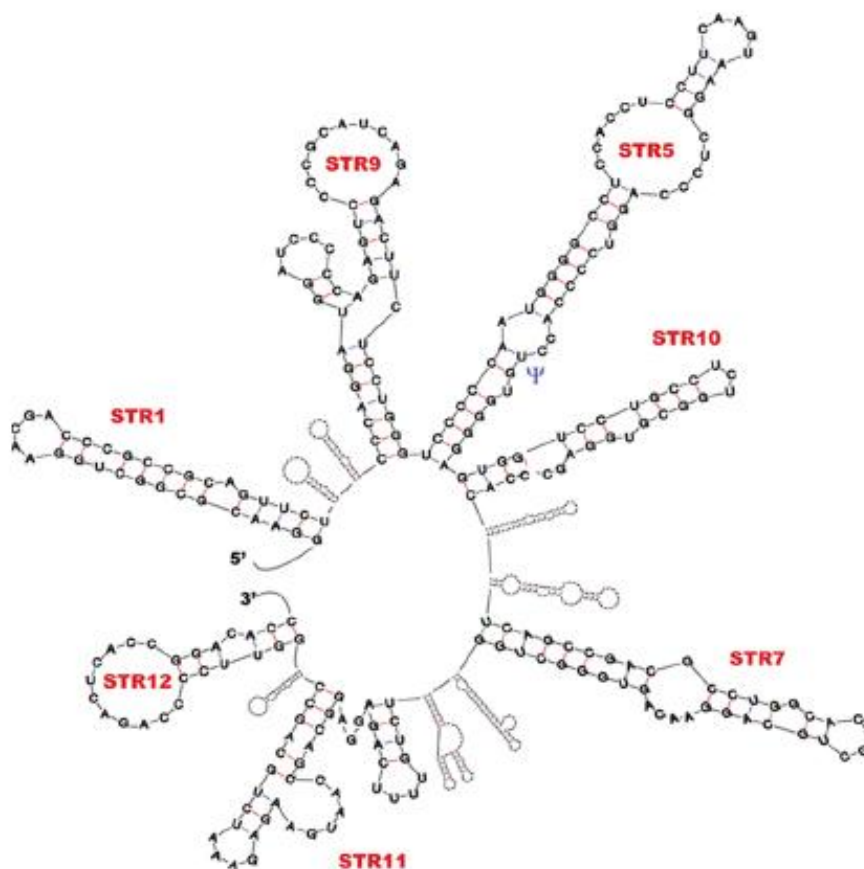


Рис. 1.34. Схема вторичной структуры SRA РНК человека (функциональная часть длиной 687 н.о., встречающаяся во всех изоформах SRA РНК). Основные структурные мотивы обозначены как STR. Сайт псевдоуридинилирования U207 отмечен символом Ψ [113].

Только 61% от общего числа транскриптов гена *SRA1* являются некодирующими, в то время как 39% содержат открытую рамку считывания, продуктом трансляции которой с альтернативных кодонов метионина является белок SRAP (224 и 236 а.о., соответственно) [111]. Как оказалось, SRAP способен связывать SRA РНК в районе фрагмента STR7 и препятствовать её взаимодействию с другими белками. Также был определен РНК-узнающий мотив в SRAP, ответственный за данное взаимодействие и представляющий собой гексапептидную последовательность LLVQEL (163-168 а.о.) [116]. Соотношение между количеством транслируемого и нетранслируемого продуктов транскрипции гена *SRA1* является одним из ключевых моментов регуляции транскрипции в клетке. На примере фактора MyoD продемонстрировано, как баланс между белком SRAP и SRA РНК может влиять на транскрипцию тех или иных генов. В присутствии избытка белка SRAP по отношению к SRA РНК, последняя не может связывать ко-активаторы транскрипции, так как её основной участок взаимодействия с белками – STR7

– связан с SRAP. В процессе дифференциации миоцитов равновесие смещается в сторону некодирующих транскриптов гена *SRA1*, количество «свободной» SRA РНК возрастает, и она может беспрепятственно взаимодействовать с активаторами транскрипции, привлекая их на MyoD-зависимый промотор и активируя транскрипцию соответствующих генов [116].

1.3.3.3. U1 мяРНК

U1 мяРНК является одной из пяти основных мяРНК U1, U2, U4, U5 и U6, которые в составе соответствующих мяРПП связываются с пре-мРНК и формируют ядро сплайсосомы. U1 мяРНК транскрибируется с помощью РНКП II и подвергается пост-транскрипционному метилированию с 5'-конца [117]. Вторичная структура U1 мяРНК человека длиной 164 н.о., а также участки связывания ассоциированных с ней белков – U1-A, U1-C, U1-70k и семи белков Sm-семейства (SmB/B0, SmD3, SmD1, SmD2, SmF, SmE and SmG) – образующих U1 мяРПП (~ 245 кДа), изображены на рис. 1.35.

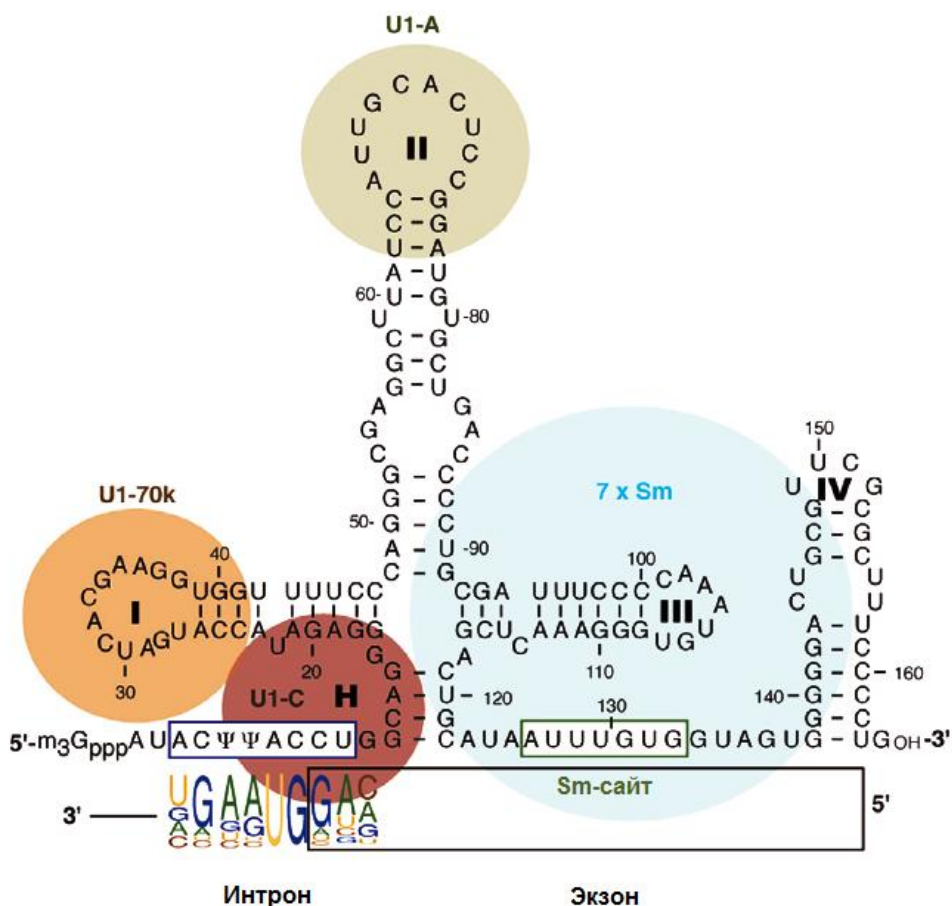


Рис. 1.35. Вторичная структура U1 мяРНК. Участки связывания белков, взаимодействующих с U1 мяРНК отмечены цветом. Участок узнавания белков семейства Sm выделен зеленой рамкой. 5'-Концевой участок U1 мяРНК, комплементарный сайту сплайсинга, выделен синей рамкой [117].

Узнавание пре-мРНК посредством U1 мяРПП является первой – инициирующей – стадией сборки сплайсосомы [118]. Основная функция U1 мяРНК заключается в

комплементационном взаимодействии её 5'-концевого участка с сайтом сплайсинга интронов, содержащим консенсусную 9-звенную последовательность. Тем не менее, помимо своей основной роли. U1 мяРНК способна специфически взаимодействовать с ТФИИ – основным транскрипционным фактором, обеспечивающим abortивную инициацию транскрипции РНКП II. ТФИИ – мультисубъединичный фактор, в состав которого входят циклин Н (CycH) и CDK7, осуществляющие первичное фосфорилирование CTD Rpb1 РНКП II (см. раздел I.3.3.1, рис. I.31). В противоположность описанным ранее регуляторным нкРНК U1 мяРНК не ингибирует, а, наоборот, стимулирует активность ТФИИ, тем самым положительно влияя на транскрипцию [119]. Было установлено, что U1 мяРНК непосредственно взаимодействует с CycH, что приводит к повышению киназной активности CDK7. В условиях транскрипции *in vitro* было показано, что присутствие в реакционной смеси U1 мяРНК повышает скорость образования первой фосфодиэфирной связи, а эффективность инициации транскрипции увеличивается более чем в 10 раз. В аналогичных экспериментах с U2 мяРНК и тРНК из *E. coli* в качестве контролей не было зафиксировано никаких изменений. Кроме того, показано, что U1 мяРНК стимулирует abortивную инициацию, а также ре-инициацию транскрипции с промотора, предшествующего 5'-сплайс-сайту [120].

I.3.3.4. DHFR нкРНК

Интересный механизм ингибирования транскрипции описан для гена *DHFR*, кодирующего дигидрофолатредуктазу (*dihydrofolate reductase*). Около 99% мРНК данного гена транскрибируется с основного промотора, однако, в условиях сывороточного голодания и замедления роста клеток «включается» альтернативный промотор, расположенный на расстоянии -403 н.п. от основной TSS [121]. В результате преждевременной терминации транскрипции образуется короткий продукт экспрессии минорного промотора – DHFR нкРНК. Поскольку основная промоторная область гена *DHFR* содержит протяженные поли(dG)-последовательности, DHFR нкРНК благодаря комплементационным взаимодействиям может образовывать пурин-пурин-пиримидиновый триплекс между РНК и ДНК. Такой триплекс находится в H-форме, что препятствует узнаванию промотора и сборке ПИК. Исходя из этого, DHFR нкРНК можно отнести к классу нкРНК, ассоциированных с промотором. Однако помимо этого DHFR нкРНК способна непосредственно взаимодействовать с транскрипционным фактором ТФИИВ в составе собранного ПИК, что приводит к его диссоциации и, как следствие, ингибированию транскрипции [122].

I.3.3.5. GAS5 РНК

Еще одним примером эукариотической нкРНК, регулирующей транскрипцию, является GAS5 (growth arrest-specific 5) РНК, идентифицированная при скрининге потенциальных опухолевых супрессоров в 1988 г. [123]. В обычных условиях GAS5 РНК быстро подвергается деградации, однако в условиях сывороточного голодания в арестованных (остановленных на определенной стадии роста) клетках, или при обработке ингибиторами трансляции наблюдается индукция её экспрессии и повышение стабильности [124]. Гены *gas5* мыши и человека содержат, соответственно, 9 или 10 интронов, кодирующих мякРНК, и 12 экзонов, кодирующих GAS5 РНК (рис. I.36А).

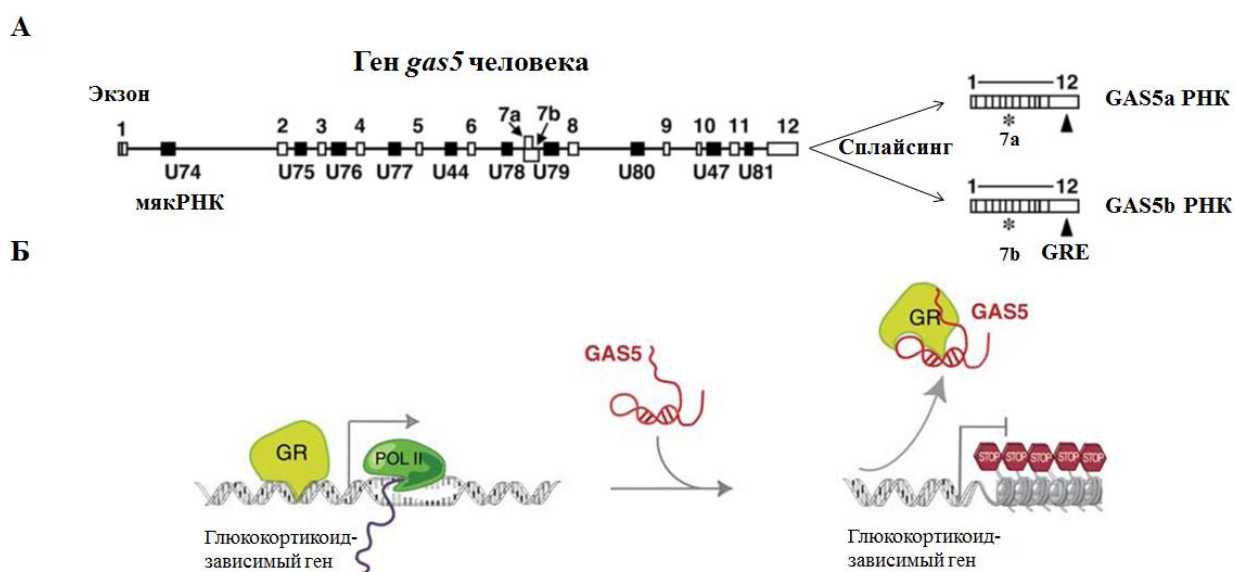


Рис. I.36. (А) Структурная организация гена *gas5* человека. Экзоны 1-12 отмечены белыми квадратами, интроны U44, U47, U74-U81 – черными квадратами [125]. (Б) Схема ингибирования транскрипции глюкокортикоидзависимого гена в присутствии GAS5 РНК [126].

После транскрипции РНК II синтезированная пре-мРНК гена *gas5* подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к существованию различных изоформ GAS5 РНК [126]. Основными вариантами GAS5 РНК являются так называемые GAS5a (598 н.о.) и GAS5b (630 н.о.) РНК, содержащие экзоны 7a или 7b, соответственно. Однако в клетке были найдены и более длинные изоформы GAS5 РНК (~ 1200–1800 н.о.), содержащие одну или несколько последовательностей, кодирующих мякРНК [125].

В нормальных условиях убиквитинилированная и полиаденилированная GAS5 РНК ассоциирована с рибосомой в цитоплазме [127]. При аресте клеточного роста GAS5 РНК транслируется в ядро, где взаимодействует с глюкокортикоидным рецептором GR (рис. I.36Б) [125]. GR является транскрипционным фактором и в присутствие кофакторов – глюкокортикоидов – связывает нуклеотидные последовательности GRE (glucocorticoid responsive element) в промоторных областях глюкокортикоидзависимых генов (в том числе антиапоптозных), тем самым активируя их транскрипцию.

Вторичная структура функциональной части GAS5 РНК имитирует конформацию палиндромной GRE-последовательности ДНК d(5'-AGAACANNNTGTTCT-3'/3'-TCTTGTNNNACAAGA-5', где N=A, T, C, G) и конкурирует с последней за связывание с GR. В результате белок теряет способность взаимодействовать с промоторами и активировать их транскрипцию (рис. I.37), что приводит к снижению эффективности клеточного метаболизма, а также повышает вероятность перехода клеток в апоптоз [128]. Можно провести аналогию между механизмами ингибирования GR-рецептора с помощью GAS5 РНК и РНКП с участием бактериальной 6S РНК, вторичная структура которой напоминает ДНК-промотор (раздел I.2).

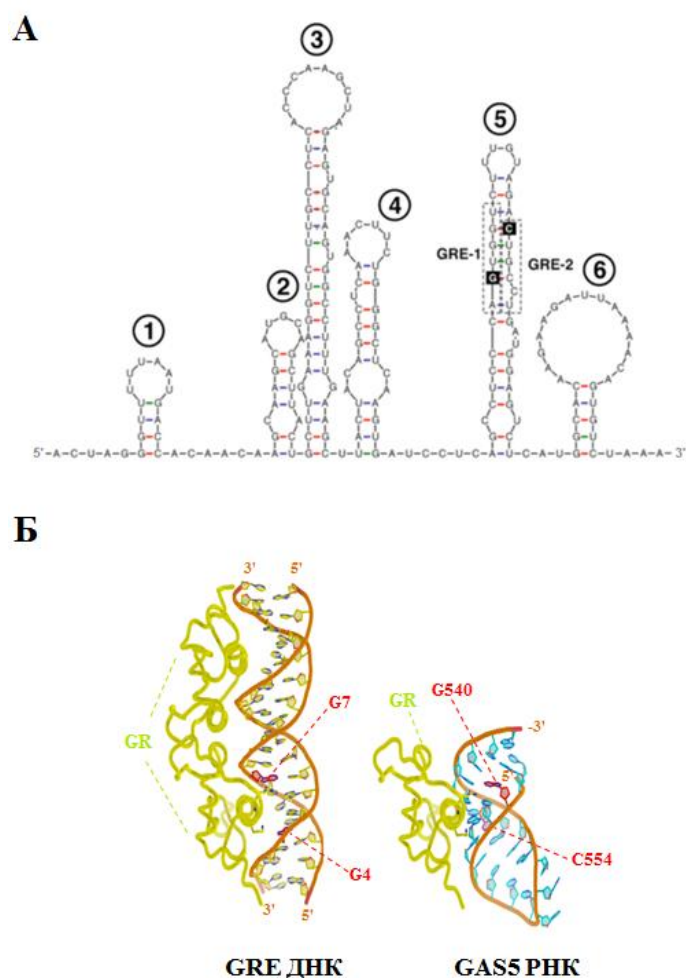


Рис. I.37. (А) Предсказанная вторичная структура функциональной области GAS5 РНК (400-598 н.о.). GRE-имитирующие Участки GAS5 РНК, имитирующие GRE-последовательности, выделены штриховой линией. Н.о. G540 и C554 отмечены черными квадратами. Комплементарные пары нуклеотидов отмечены синим и красным цветами, неканонические пары нуклеотидов U•G – зеленым цветом. (Б) Трехмерная модель ДНК-связывающего домена GR, взаимодействующего с GRE ДНК (слева) и GRE-имитирующим участком GAS5 РНК (справа). Нуклеозиды, контактирующие с K442 и R447 ДНК-связывающего домена GR, выделены красным [125].

В ходе делеционного анализа GAS5 РНК был выявлен конкретный участок молекулы (400-598 н.о.), ответственный за связывание с рецептором GR и ингибирование его активности [125]. Данная область закодирована в 12-ом экзоне гена *gas5* и встречается во

всех найденных изоформах GAS5 РНК. Как видно из рис. I.37А, шпилька 5 содержит двухцепочечный фрагмент, кодирующий последовательности GRE-1 (539-544 н.о.) и GRE-2 (553-559 н.о.), которые имитируют участок узнавания GR в ДНК. Два н.о. – G540 и C554 (рис. I.37А) – консервативны среди консенсусных GRE-последовательностей человека и взаимодействуют, соответственно, с K442 и R447 а.о. ДНК-связывающего домена белка GR. Замена каждого из этих а.о. (или обоих) на остаток Ala приводят к существенной (или почти полной) потере сродства белка GR к GAS5 РНК. На основании предполагаемой вторичной структуры шпильки 6 в GAS5 РНК и кристаллической структуры ДНК-связывающего домена фактора GR была построена трехмерная модель их комплекса (рис. I.37Б). В комплексе белка GR с GRE ДНК а.о. K442 и R447 направлены в большую бороздку ДНК и взаимодействуют с нуклеотидами G7 и G4, расположенными в противоположных цепях ДНК и разделенными расстоянием в половину витка двойной спирали. Два н.о. G540 и C554 в GAS5 РНК также разделены половиной витка спирали и ориентированы в пространстве аналогично нуклеотидам GRE в ДНК. Нуклеотидные замены в данной области GAS5 РНК, нарушающие GRE-имитирующий двухцепочечный участок, а также замена C554U при сохранении стабильности двойной спирали, приводили к потере способности GAS5 РНК ингибировать GR-зависимую транскрипцию с MMTV (mouse mammary tumor virus) промотора *in vivo* [125].

GAS5 РНК нестабильна в раковых клетках и подвергается деградации с помощью механизма, распознающего «бессмысленные» последовательности мРНК - NMD (nonsense-mediated RNA decay) [124]. Таким способом раковые клетки повышают свою жизнеспособность в условиях нехватки питательных веществ [127]. Помимо своей основной функции GAS5 РНК способна подавлять экспрессию многих других стероид-зависимых рецепторов. Это позволяет провести аналогию между GAS5 РНК и SRA РНК и, возможно, свидетельствует о схожести механизмов регуляции транскрипции с помощью этих нкРНК [125].

Таким образом, огромное количество идентифицированных на сегодняшний день нкРНК вовлечено в различные процессы регуляции транскрипции, как на уровне конкретных генов, так и на более глобальном уровне. Многообразие этих нкРНК и механизмов их действия, несомненно, указывает на их чрезвычайную важность для жизнедеятельности клетки и её адаптации в стрессовых условиях. Сходные черты, наблюдаемые в случае бактериальных и эукариотических нкРНК, позволяют выявить общие закономерности и направления эволюции. В связи с этим изучение 6S РНК из различных бактерий представляет собой перспективную задачу для исследования.

ГЛАВА II

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ 6S-1 И 6S-2 РНК ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ

(Обсуждение результатов)

Как было описано в разделе I.2, малые некодирующие 6S РНК играют чрезвычайно важную роль в клетках прокариот, взаимодействуя с РНКП и ингибируя транскрипцию многих генов. Исключительной особенностью грамположительной бактерии *B. subtilis* является наличие двух различных 6S РНК (6S-1 и 6S-2) длиной 190 и 203 н.о., соответственно, выделенных при иммуноосаждении с РНКП *B. subtilis* [52, 53]. Отнесение обнаруженных РНК к 6S РНК было сделано в первую очередь на основе предсказания их вторичных структур, как и 6S РНК *E. coli* представляющих собой нерегулярную двойную спираль с обширным расплетенным участком в центре (см. раздел I.2.3.2., рис. I.18) [44]. Однако никаких экспериментальных доказательств ингибирующей способности 6S-1 и/или 6S-2 РНК *B. subtilis*, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, в литературе описано не было. На основании анализа профилей экспрессии обеих 6S РНК в клетке, полученных в работе [4], было высказано предположение, что 6S-1 РНК *B. subtilis* является гомологом 6S РНК *E. coli*, поскольку её максимальная концентрация наблюдалась в стационарной фазе роста клеток. Присутствие 6S-2 РНК на протяжении всей экспоненциальной фазы роста клеток стало неожиданным открытием, подтверждающим отличие её свойств, а возможно и функций, от 6S РНК *E. coli*.

В связи с этим основной целью работы являлся сравнительный анализ свойств 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* для выяснения их возможной роли в ингибировании транскрипции генов. В первую очередь необходимо было выделить холофермент РНКП *B. subtilis*, а также получить генетические конструкции для T7-транскрипции 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*. Для характеристики способности 6S-1 и 6S-2 РНК ингибировать транскрипцию планировалось провести комплексообразование этих нкРНК с РНКП и оценить сродство каждой из 6S РНК к ферменту, а также изучить влияние этих нкРНК на транскрипцию *in vitro* с природных промоторов модельных генов *B. subtilis*. Как было описано в разделе I.2.2.3, характерной чертой 6S РНК является использование их РНК-полимеразой для РНК-зависимого синтеза коротких транскриптов – пРНК. В связи с этим необходимо было проверить, осуществляется ли синтез пРНК на матрицах 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* и оценить эффективность этого процесса. Для установления функциональной роли 6S-1 и 6S-2 РНК *in vivo* было решено провести сравнительный анализ жизнеспособности клеточных линий *B. subtilis*, содержащих делеции генов *bsrA* и/или *bsrB* (кодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК, соответственно), а также сравнить полные протеомы полученных

нокаутных штаммов с клетками дикого типа. Таким образом, комплексный подход к характеристике 6S-1 и 6S-2 РНК, включающий в себя *in vitro* и *in vivo* анализ их свойств и функций, позволил бы ответить на вопрос об участии этих нкРНК в регуляции транскрипции и о возможном отличии механизмов их взаимодействия с РНКП от 6S РНК *E. coli*.

II.1. Выделение 6S-1 и 6S-2 РНК *Bacillus subtilis*

Стандартным способом синтеза РНК-фрагментов является транскрипция *in vitro* с помощью РНК-полимеразы фага Т7. ДНК-зависимая РНК-полимераза Т7 узнает в ДНК последовательность 5'-d(ТААТАСГАСТСАСТАТА)-3' и начинает транскрипцию с первого нуклеотида, расположенного сразу после неё. Максимальная эффективность синтеза РНК наблюдается, если следующая за промотором последовательность начинается с гексануклеотида 5'-d(GGGAGA)-3', однако уже двух остатков dG в положениях +1 и +2 достаточно для высоких выходов транскриптов [129]. В соответствии с этими «требованиями» на основе вектора pUC18 (содержащего ген устойчивости к ампициллину) нами были сконструированы плазмиды pBB_T7_bsrA и pBB_T7_bsrB, несущие гены *bsrA* (6S-1 РНК) и *bsrB* (6S-2 РНК), под контролем Т7-промотора (рис. II.1). Поскольку последовательность гена 6S-1 РНК начинается с dA, а гена 6S-2 РНК – с dG, данные конструкции содержали дополнительно два остатка dG перед геном *bsrA* и один остаток dG перед геном *bsrB*.

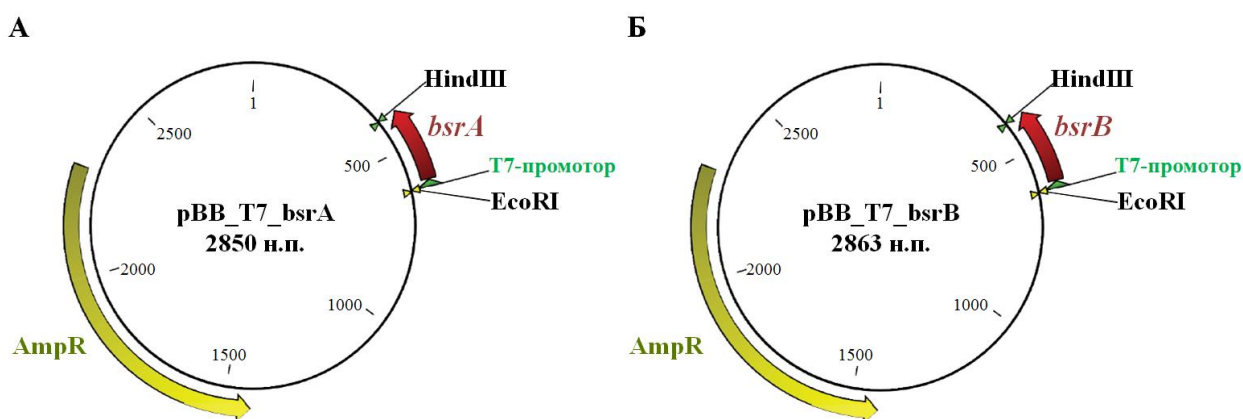


Рис. II.1. Схемы плазмид pBB_T7_bsrA (А) и pBB_T7_bsrB (Б) с указанием расположения основных элементов.

Плазмиды трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5α. После культивации полученных клеточных линий в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) проводили выделение плазмид как описано в главе «Экспериментальная часть». Как правило, из 500 мл клеточной культуры удавалось выделить ~ 200-400 мкг гомогенной плазмидной ДНК. Для перевода плазмид в линейную форму их гидролизовали эндонуклеазой

рестрикции HindIII. Степень расщепления ДНК проверяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле (рис. II.2А).

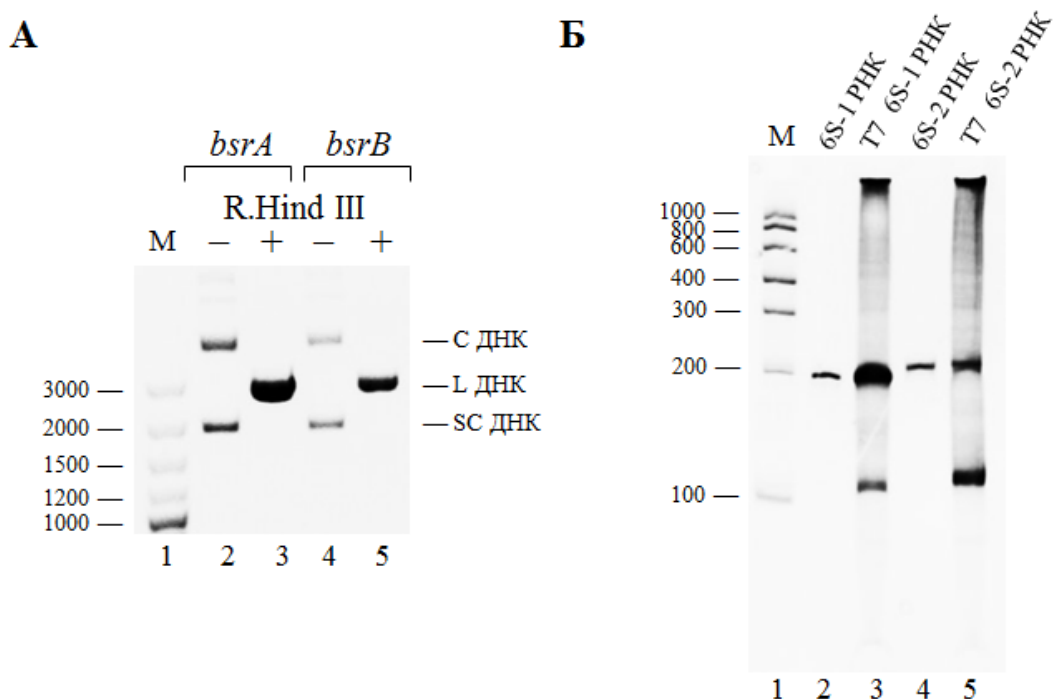


Рис. II.2. (А) Оценка эффективности гидролиза плазмидных ДНК pBB_T7_ *bsrA* и pBB_T7_ *bsrB* эндонуклеазой рестрикции HindIII. Формы ДНК: SC – суперскрученная, С – кольцевая, L – линейризованная. Дорожки 2 и 4 – плазмидная ДНК (~ 0,2 мкг), содержащая гены *bsrA* и *bsrB*, до гидролиза, дорожки 3 и 5 – плазмидная ДНК (~ 0,5 мкг), содержащая гены *bsrA* и *bsrB*, после гидролиза R.HindIII, дорожка 1 – ДНК-маркер (длина фрагментов (н.п.) указана слева). Фотография под УФ-светом 1%-ного агарозного геля, окрашенного раствором бромид этидия. (Б) Анализ продуктов Т7-транскрипции генов *bsrA* и *bsrB* (дорожки 3 и 5) и выделенных препаратов 6S-1 и 6S-2 РНК (дорожки 2 и 4, ~ 1 мкг РНК). Дорожка 1 – РНК-маркер (длина фрагмента, н.о., указана слева). Фотография под УФ-светом 8%-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины и окрашенного раствором бромид этидия.

Линейризованные ДНК использовали в качестве матриц для Т7-транскрипции, которую проводили по стандартному протоколу (см. главу «Экспериментальная часть»). Продукты транскрипции экстрагировали, осаждали этанолом, и выделяли из 8%-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины. На рис. II.2Б приведен результат ферментативного синтеза 6S-1 и 6S-2 РНК. Видно, что в процессе транскрипции наблюдается значительная деградация полученных РНК и/или синтез побочных продуктов (рис. II.2Б, дорожки 3 и 5). Применяемая методика пост-транскрипционной очистки препаратов 6S РНК позволяет полностью избавиться от нежелательных примесей (рис. II.2Б, дорожки 2 и 4). Длина полученных 6S-1- и 6S-2-транскриптов также соответствует рассчитанной: 192 н.о. для 6S-1 РНК и 204 н.о. для 6S-2 РНК. Таким образом, были выделены гомогенные препараты 6S-1 и 6S-2 РНК из *B. subtilis* в значительных количествах: ~ 400-600 мкг в ходе одной реакции Т7-транскрипции (объем реакционной смеси – 0,5 мл, количество ДНК-матрицы – 40 мкг).

II. 2. Выделение РНК-полимеразы *Bacillus subtilis*

Как известно, бактериальная РНКП представляет собой мультисубъединичный фермент, состоящий из четырех основных субъединиц – β (~ 133,7 кДа, *rpoB*), β' (~ 134,3 кДа, *rpoC*) и двух α (~ 34,8 кДа, *rpoA*), образующих кор-фермент, способный к элонгации транскрипции [130]. За узнавание промоторов ДНК и инициацию транскрипции отвечает отдельный фактор σ , который, связываясь с кор-ферментом РНКП, образует так называемый холофермент. Основным σ -фактором *B. subtilis*, участвующим в транскрипции большинства генов «домашнего хозяйства» («house-keeping» genes), является σ^A (~ 43 кДа, *sigA*), – гомолог фактора σ^{70} *E. coli*. Нами были опробованы три различные методики выделения кор-фермента и холофермента РНКП. Две из них описаны в работах [131] и [132], третья – разработана в сотрудничестве с лабораторией проф. М. Салас (Центр молекулярной биологии имени С. Очоа, Автономный Университет Мадрида, Испания). Кроме того, было проведено отдельное выделение σ^A -субъединицы РНКП [131].

Основным преимуществом первой методики [131] являлась возможность выделения не только кор-фермента РНКП, содержащего субъединицы $\alpha\alpha\beta\beta'$, но и двух других вариантов кор-РНКП, в составе которых содержались малые субъединицы $\omega 1$ (~ 8,3 кДа, *ukzG*) или $\omega 2$ (~ 7,8 кДа, *yloH/rpoZ*)¹⁵. Культуры клеток *E. coli*, трансформированные соответствующими плазмидами, выращивали в присутствии ампициллина или ампициллина и хлорамфеникола (см. главу «Экспериментальная часть»). Экспрессию целевого белка индуцировали с помощью добавления изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозида (ИПТГ). Все варианты кор-РНКП содержали гексагистидиновые последовательности на С-конце β' -субъединицы и были последовательно очищены с помощью аффинной хроматографии на колонке NiTrap (GE Healthcare, Швейцария) с Ni^{2+} -сефарозой и ионообменной ВЭЖХ на колонке MonoQ Методика 1 в главе «Экспериментальная часть»). Выделение σ^A -фактора, содержащего на С-конце блок из шести остатков гистидина (σ^A_{HIS}), проводили аналогично, причем первой стадии очистки было достаточно для получения практически гомогенного препарата (рис. II.3). Фракции белков анализировали с помощью гель-электрофореза по Лэммли. Как видно из рис. II.3, гомогенность полученных препаратов кор-РНКП, в отличие от σ^A , была чрезвычайно низка. Все полученные варианты белка после реконструкции холофермента РНКП были

¹⁵ Белок ω выполняет структурную функцию при сборке холофермента РНКП *E. coli in vitro* и *in vivo*, взаимодействуя с β' -субъединицей. Субъединица $\omega 2$ РНКП *B. subtilis* гомологична ω -субъединице РНКП *E. coli*, а также белкам RpoK архей и RPB6 эукариот, участвующим в сборке соответствующих РНКП. Субъединица $\omega 1$ РНКП *B. subtilis* характеризуется низкой степенью гомологии с перечисленными белками и её локализация в составе холофермента РНКП, по-видимому, отличается от субъединицы $\omega 2$ [133].

неактивны в экспериментах по транскрипции *in vitro*, что привело к отказу от данной методики.

Отметим, что еще одной малой субъединицей в составе кор-фермента РНКП является белок δ (~ 20,4 кДа, *rpoE*). Его функция, также как и функции субъединиц $\omega 1$ и $\omega 2$, до конца не изучены. Отсутствие δ -субъединицы в составе холофермента РНКП существенно влияет на специфичность узнавания промоторов и сродство фермента к синтезированной *de novo* мРНК [134]. С этой точки зрения основным недостатком большинства методик выделения гомогенного препарата РНКП *B. subtilis* является многостадийная очистка фермента, в процессе которой малые субъединицы «теряются». Кроме того, нельзя исключить влияние на функционирование РНКП дополнительных факторов белковой природы, ассоциированных с ферментом. Поскольку в работе планировалось изучить влияние 6S РНК *B. subtilis* на транскрипцию генов *in vitro*, а специфика взаимодействий 6S РНК *B. subtilis* с РНКП в зависимости от субъединичного состава фермента не была известна, было принято решение упростить методику выделения белка с целью получения максимально активного фермента.

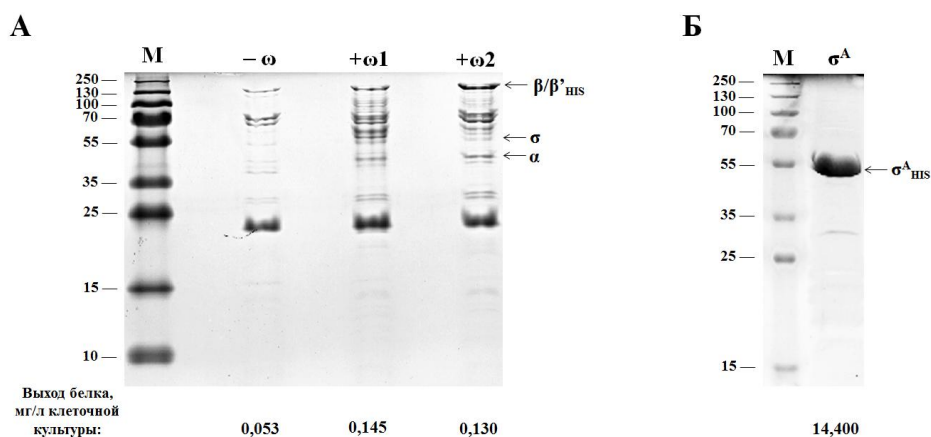


Рис. П.3. Анализ гомогенности препаратов РНКП (А) и σ^A * (Б) методом электрофореза в 15%-ном ДСН-ПААГ (окрашивание кумасси G-250). М: набор белков-маркеров молекулярной массы, кДа (указаны слева).

* Подвижность в геле субъединицы σ^A не соответствует рассчитанной молекулярной массе (~ 44 кДа). Подобное поведение белка при гель-электрофорезе является его характерной особенностью, вероятно, из-за наличия протяженных положительно и отрицательно заряженных аминокислотных кластеров [135].

В Методике 2 (глава «Экспериментальная часть») использовали клетки *B. subtilis* штамма МН5636, геном которых содержит на 3'-конце гена *rpoC* дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую 10 остатков гистидина [136]. *B. subtilis* МН5636 является производным широко используемого штамма JH642 и не имеет устойчивости к антибиотикам. Экспрессия всех субъединиц белка происходит с их природных промоторов без дополнительного воздействия. Выделение холофермента РНКП проводили в одну стадию методом аффинной хроматографии Ni^{2+} -NTA-агарозе. Фракции, собранные в процессе выделения, анализировали методом гель-

электрофореза (рис. П.4). Сравнение молекулярных масс наиболее интенсивных зон с расположением зон белков-маркеров молекулярной массы, позволяет утверждать о наличии всех основных субъединиц¹⁶ РНКП в выделенном белке: $\alpha \sim 34$ кДа, $\beta \sim 134$ кДа, $\beta'_{\text{HIS}} \sim 136$ кДа, $\sigma^A \sim 43$ кДа (рис. П.4, дорожка 3).

Следуя данной методике, из 1 л клеточной культуры можно выделить ~ 190 мкг белка. Концентрацию полученного препарата РНКП определяли методом Брэдфорд. Она составила $\sim 0,7$ мкг/мкл или $\sim 1,75$ мкМ (молекулярная масса холофермента РНКП с учетом малых субъединиц ω и δ составляет ~ 400 кДа). Выделенная РНКП демонстрировала высокую процессивность в реакции транскрипции *in vitro* (рис. П.5). Ранее была описана возможность использования РНКП низкой степени очистки (выделенной только с помощью аффинной хроматографии) для изучения транскрипции генов [137].

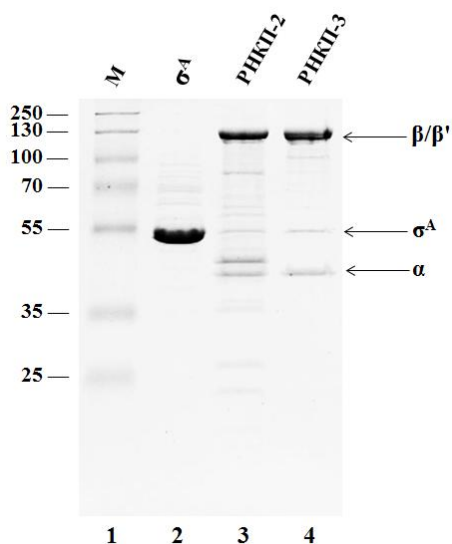


Рис. П.4. Электрофоретический анализ в 15%-ном ДСН-ПААГ гомогенности препаратов холофермента РНКП (~ 4 мкг), выделенных по Методике 2 (дорожка 3) и Методике 3 (дорожка 4). Дорожка 2 – препарат белка σ^A *B. subtilis*, предоставленный проф. М. Салас. Дорожка 1 – набор белков-маркеров молекулярной массы, кДа (указаны слева). Фотография геля после окрашивания раствором кумасси G-250.

Для выяснения механизма взаимодействия 6S РНК и РНКП *B. subtilis* требовался более гомогенный препарат фермента. Был разработан специальный многостадийный протокол выделения нативного белка РНКП *B. subtilis* из клеток штамма 110NA (Методика 3 в главе «Экспериментальная часть»). Экспрессия всех субъединиц фермента происходила с их природных промоторов без дополнительной индукции.

Первая стадия выделения РНКП из клеточного лизата заключалась в осаждении белков и ДНК в буфере, содержащем 9% (*m/V*) ПЭГ-6000 и 1,7% (*m/V*) декстрана-500, а затем в частичном растворении осажденных белков при добавлении NaCl до концентрации 1,5 М. При повышении концентрации NaCl до 4 М белковая фракция, содержащая РНКП, переходила в раствор. Часть примесных белков затем осаждали

¹⁶ Предполагаемые субъединицы РНКП были извлечены из соответствующих зон геля и подвергнуты протеолизу трипсином. Последующий анализ методом масс-спектрометрии MALDI-TOF подтвердил их соответствие субъединицам РНКП *B. subtilis* β , α и σ^A .

добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 33% (*m/V*), что также приводило к разделению фаз и избавлению от ПЭГ. Последующее повышение концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 65% (*m/V*) приводило к повторному осаждению РНКП, тогда как часть других белков оставалась в растворе. После растворения полученного осадка проводили вторую стадию очистки препарата РНКП методом жидкостной хроматографии низкого давления на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракции, содержащие целевой белок, элюировали с колонки ступенчатым градиентом водного раствора KCl (300-350 мМ). На третьей стадии полученные белковые фракции очищали методом хроматографии на ДНК-целлюлозе. Варьирование концентрации KCl при элюции белка с колонки позволяет получать РНКП различной степени чистоты (см. главу «Экспериментальная часть»). В данной работе были использованы фракции, полученные при элюции белка 600-700 мМ раствором KCl. После объединения целевых фракций, проведения диализа против буфера ВПГ (см. главу «Экспериментальная часть») и концентрирования гомогенность полученного белка (РНКП-3) сравнили с препаратом РНКП, выделенным по Методике 2 (РНКП-2). Как видно из рис. П.4, разработанный новый протокол выделения позволяет добиться существенной степени гомогенности препарата. Однако транскрипционная активность РНКП-3 в экспериментах по транскрипции *in vitro* (рис. П.5) была значительно ниже (~ 10 раз) по сравнению с РНКП-2, возможно, из-за «потери» малых субъединиц в процессе очистки белка.

Таким образом, согласно Методике 3, был получен гомогенный препарат РНКП с концентрацией 8 мг/мл (~ 2 мкМ). Из 1 л клеточной культуры, следуя данному протоколу, можно выделить ~ 2,2 мг белка.

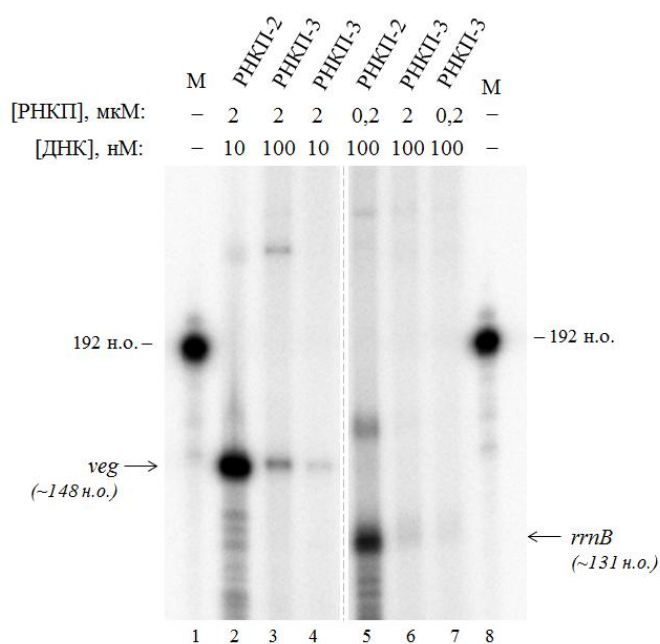


Рис. П.5. Анализ активности выделенных препаратов РНКП в реакции транскрипции *in vitro* в присутствии четырех NTP (200 мкМ каждого) и 0,5 мкКи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. РНКП-2 – препарат РНКП *B. subtilis*, выделенный по Методике 2, РНКП-3 – выделенный по Методике 3. Дорожки 2-4 – транскрипция с промотора гена *veg*, дорожки 5-7 – транскрипция с промотора гена *rrnB* (см. раздел П.4). Дорожки 1 и 8 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'- ^{32}P -меченная 6S-1 РНК). Радиоавтограф 5%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

II.3. Изучение комплексообразования 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП

Характерной чертой 6S РНК является её специфическое связывание с РНКП с образованием стабильного комплекса РНКП:6S РНК, аналогичного «открытому» комплексу фермента с промотором ДНК. Для проверки способности 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* взаимодействовать с полимеразой, изучали комплексообразование полученных Т7-транскрипцией 5'-[³²P]-меченных 6S РНК и холофермента РНКП *B. subtilis* повышенной степени очистки (Методика 3 в главе «Экспериментальная часть»). Для восстановления правильной вторичной структуры 6S-1 РНК и 6S-2 РНК непосредственно перед проведением комплексообразования проводили процедуру ренатурации (см. главу «Экспериментальная часть»).

После совместной инкубации ренатурированных 6S РНК с РНКП в течение 30 мин при 37°C в буфере, содержащем различное количество гепарина (10-1000 нг/мкг) для предотвращения неспецифических взаимодействий, реакционные смеси анализировали методом «торможения в геле» в неденатурирующих условиях. Поскольку молекулярная масса холофермента РНКП составляет ~ 400 кДа, электрофорез проводили в ПААГ низкой процентности (5%). Как в случае 6S-1 РНК, так и в случае 6S-2 РНК наблюдали образование единственного стабильного комплекса с РНКП, характеризующегося гораздо более низкой подвижностью в геле по сравнению со свободными 6S РНК (рис. II.6).

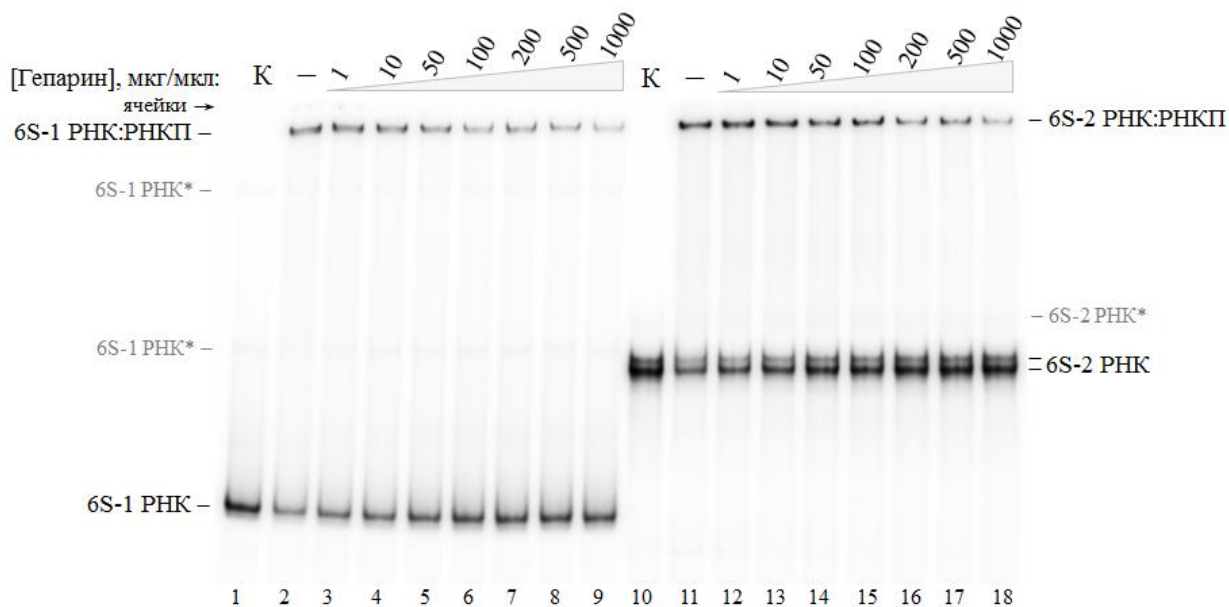


Рис. II.6. Комплексообразование 5'-[³²P]-меченных 6S-1 РНК и 6S-2 РНК (100 нМ) с холоферментом РНКП *B. subtilis* (500 нМ) в присутствии возрастающих количеств гепарина (1–1000 нг/мкл соответствует ~ 5мкМ–5 мМ). Дорожки 2 и 11 – комплексообразование 6S-1 РНК и 6S-2 РНК с РНКП в отсутствие гепарина. Дорожки 1 и 10 – исходные 6S-1 РНК и 6S-2 РНК. Как 6S-1 РНК* и 6S-2 РНК* (выделены серым шрифтом) отмечены продукты неполной ренатурации РНК. Радиоавтограф 5%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Увеличение концентрации неспецифического лиганда, конкурентно связывающего фермент, приводило лишь к незначительному уменьшению фракции комплексов 6S-1 РНК:РНКП и 6S-2 РНК:РНКП. Все последующие эксперименты проводили при концентрации гепарина 100 нг/мкл (рис. II.6, дорожки 6 и 15). Отметим, что, несмотря на малое различие длин 6S-1 и 6S-2 РНК (192 н.о. и 204 н.о., соответственно), подвижность двух РНК в неденатурирующем геле существенно отличается. Это может свидетельствовать о более компактной вторичной структуре 6S-1 РНК по сравнению с 6S-2 РНК. Кроме того, 6S-2 РНК в неденатурирующих условиях, как правило, мигрирует в геле в виде двух полос примерно одинаковой интенсивности, что говорит о существовании в растворе равновесия между двумя или более конформациями молекулы.

Для сравнения сродства 6S-1 и 6S-2 РНК к РНКП были проведены эксперименты по анализу связывания фиксированного количества РНК (100 нМ) в присутствии возрастающих количеств фермента (50-3000 нМ) (рис. II.7А, Б).

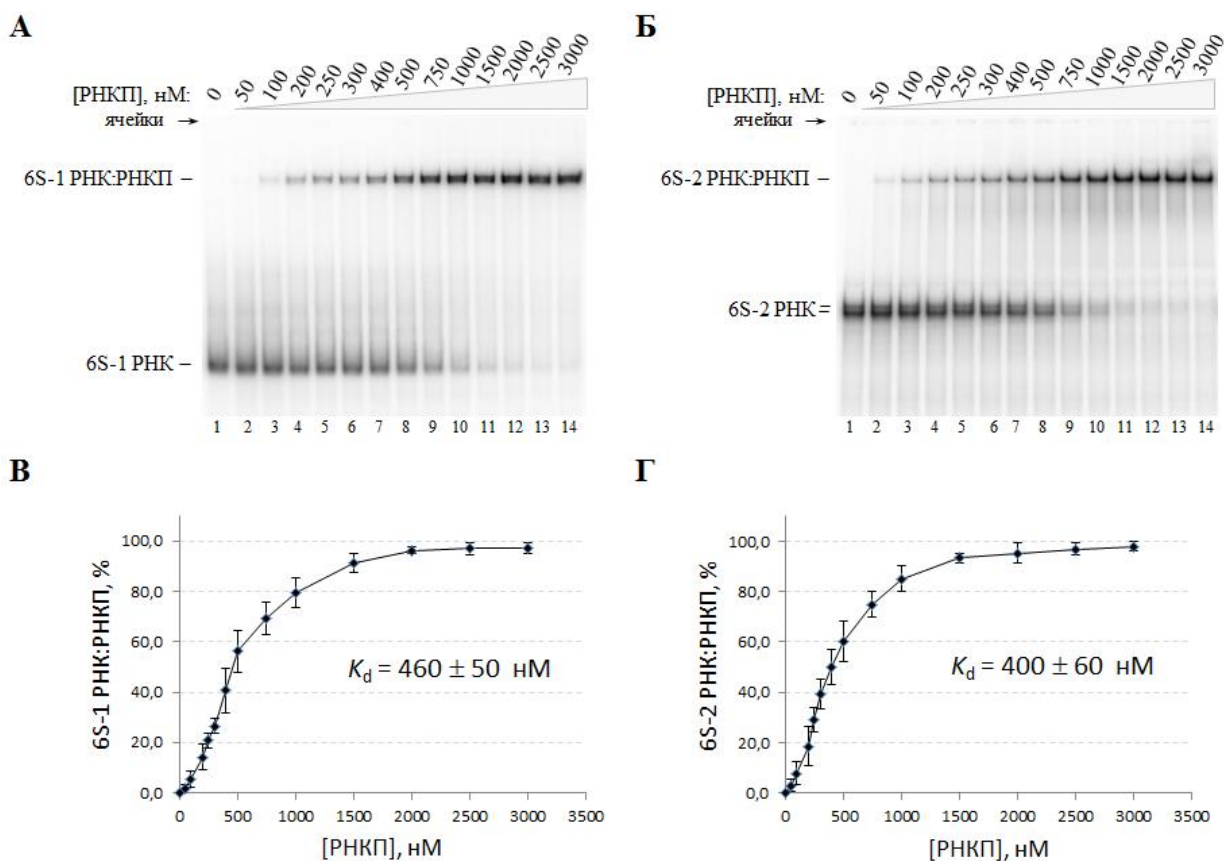


Рис. II.7. Оценка сродства 6S-1 и 6S-2 РНК к РНКП *B. subtilis*. (А, Б) Комплексообразование 6S-1 РНК и 6S-2 РНК (100 нМ) с холоферментом РНКП (50-3000 нМ) в присутствии 100 нг/мкл гепарина (дорожки 2-14). Дорожки 1 – исходные 6S-1 РНК или 6S-2 РНК. Радиоавтографы 5%-ных ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. (В, Г) Графики зависимости степени образования комплексов 6S-1 РНК:РНКП (В) и 6S-2 РНК:РНКП (Г) от концентрации холофермента РНКП (50-3000 нМ).

Интенсивности радиоактивных зон, соответствующих свободным 6S РНК и их комплексам с РНКП, обчитывались, и на основании полученных результатов были

построены графики зависимости и определены равновесные константы диссоциации¹⁷ (K_d) образующихся комплексов 6S-1 РНК:РНКП и 6S-2 РНК:РНКП (рис. П.7В, Г). Значение K_d для комплексов 6S-1 РНК и 6S-2 РНК с РНКП имели сравнимые значения (460 ± 50 нМ и 400 ± 60 нМ, соответственно) в пределах погрешности эксперимента. Следовательно, обе 6S РНК характеризуются близкой степенью сродства к ферменту.

II. 4. Изучение конкуренции между 6S-1/6S-2 РНК и промоторами ДНК в условиях транскрипции *in vitro*

Как упоминалось ранее, основной функцией 6S РНК *E. coli* является ингибирование транскрипции за счет конкуренции с промоторами ДНК за связывание с активным центром РНКП (раздел I.2.2.3 в главе «Обзор литературы»). В данной работе прежде всего было необходимо выяснить, обладают ли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* этой способностью.

В системе *E. coli* было обнаружено, что 6S РНК ингибирует транскрипцию генов в первую очередь с σ^{70} -зависимых промоторов. В клетках *B. subtilis* гомологом σ^{70} -фактора *E. coli* является фактор σ^A , инициирующий транскрипцию более чем с 90% промоторов генов «домашнего хозяйства», активных в экспоненциальной фазе роста клетки [139]. Известно, что эффективность транскрипции определяется «силой» промотора, зависящей от его нуклеотидной последовательности, и природой стартового нуклеотида (TSS). σ^A -Зависимые консенсусные -10 и -35 промоторные элементы *B. subtilis* не отличаются от *E. coli* и представляют собой гексануклеотиды 5'-d(TATAAT)-3' и 5'-d(TTGACA)-3', соответственно, расположенные в кодирующей цепи двуцепочечной ДНК. Транскрипция генов *B. subtilis*, активных в экспоненциальной фазе роста клетки, как правило, инициируется с dG в +1 позиции, тогда как для генов, активных в стационарной фазе, стартовой точкой транскрипции обычно является dA [140]. Поскольку профили экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК прямопротивоположны (максимум экспрессии 6S-1 РНК приходится на раннюю стационарную, а 6S-2 РНК – на экспоненциальную фазу роста клетки [4]) было высказано предположение, что природа стартового нуклеотида также может существенно влиять на наличие/отсутствие ингибирующего эффекта 6S РНК. Кроме того, в системе *E. coli* было показано, что наиболее «чувствительными» к ингибированию посредством 6S РНК являются гены с расширенной -10 промоторной областью, содержащей динуклеотид 5'-d(TG)-3' в -12 положении относительно TSS [34].

Для исследования способности 6S-1 и 6S-2 РНК ингибировать транскрипцию нами были выбраны два описанных в литературе σ^A -зависимых промотора генов

¹⁷ K_d , принималась равной концентрации фермента при 50%-ном связывании 6S РНК [138].

rrnB-16S (далее *rrnB*) и *veg* [140], кодирующих, соответственно, рибосомную РНК и белок с неизвестной функцией. Промотор гена *rrnB* содержал расширенную -10 промоторную область и dG в +1 позиции, тогда как транскрипция с промотора гена *veg* начиналась с dA (рис. II.8).



Рис. II.8. Организация промоторных областей генов *rrnB* и *veg* *B. subtilis*. Стрелками указаны направления и стартовые точки транскрипции.

Фрагменты ДНК (длиной 244 н.п. и 288 н.п.), содержащие соответствующие промоторные элементы, получали с помощью ПЦР (см. главу «Экспериментальная часть»). Транскрипцию *in vitro* проводили в присутствии [α - 32 P]УТР и холофермента РНКП, выделенного согласно Методике 2 (см. главу «Экспериментальная часть»). Продукты реакции разделяли в 5%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Относительный выход РНК-транскрипта оценивали на основании обчета интенсивностей соответствующих радиоактивных зон, принимая максимальный результат за 100%. На первом этапе в случае промотора гена *rrnB* были подобраны оптимальные условия реакции, обеспечивающие наиболее эффективный синтез РНК (рис. II.9). Как видно из рис. II.9А, активность фермента достаточно высока, а длина полученных РНК-транскриптов меньше 192 н.о., что соответствует длине, предсказанной теоретически (131 н.о.). Наибольшая эффективность транскрипции в присутствии 100 нМ РНКП наблюдалась следующих условиях: 100 нМ ДНК-матрицы, 5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого из АТР, СТР, ГТР, 50 мкМ УТР¹⁸ (рис. II.9А-Г). Добавление гепарина, неспецифически взаимодействующего с РНКП, в концентрации 50-100 нг/мкл лишь незначительно снижало уровень транскрипции (рис. II.9Д), а дальнейшее повышение его количества в реакционной смеси практически не влияло на выход транскрипта. Поэтому все дальнейшие эксперименты по транскрипции *in vitro* проводили при концентрации гепарина 100 нг/мкл. Предварительное «насыщение» холофермента РНКП избытками σ^A -фактора приводило к повышению активности фермента всего лишь на 15% (рис. II.9Е), что свидетельствует о высокой активности исходного препарата полимеразы. В связи с этим в экспериментах было решено использовать РНКП без дополнительного добавления σ^A .

¹⁸ Понижение концентрации УТР относительно трех других НТР увеличивает эффективность встраивания в синтезируемую цепь РНК остатка [α - 32 P]U при использовании [α - 32 P]УТР.

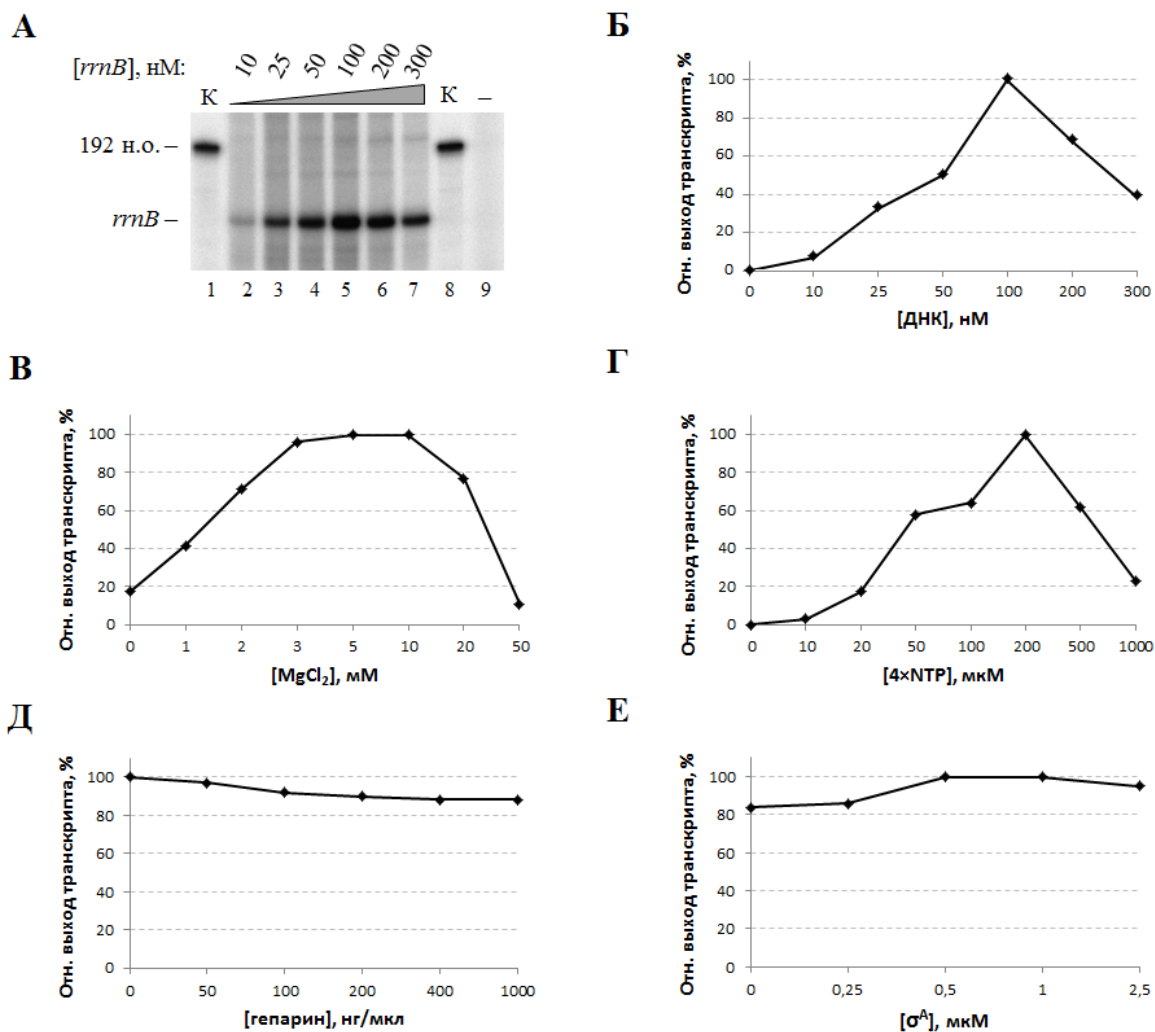


Рис. 2.9. Подбор оптимальных условий транскрипции *in vitro* с промотора гена *rrnB*. Финальная концентрация (ф. к.): 100 нМ РНКП, 100 нМ ДНК, 5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого из АТР, СТР, ГТР, 50 мкМ УТР, 0,5 мкКи [α-³²P]УТР, 100 нг/мкл гепарина (если не указано иное). (А) Зависимость эффективности транскрипции от концентрации ДНК-матрицы. Дорожки 1 и 8 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'-[³²P]-меченная 6S-1 РНК), дорожка 9 – транскрипция в отсутствие ДНК (отрицательный контроль). Дорожки 2-7 – транскрипция при возрастающих концентрациях ДНК (10-300 нМ). Радиоавтограф 5%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины). **Б-Е** – Графики зависимости выхода транскрипта с промотора *rrnB* от концентрации ДНК-матрицы (**Б**), MgCl₂ (**В**), нуклеозидтрифосфатов (**Г**), гепарина (**Д**) и σ^A-фактора (**Е**). При варьировании концентрации NTP концентрация УТР была в 4 раза меньше концентраций каждого из остальных трех NTP. Максимальную эффективность транскрипции в каждом эксперименте принимали за 100%.

Для изучения влияния 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* на транскрипцию *in vitro* генов *rrnB* и *veg* РНК-полимеразу *B. subtilis* вначале инкубировали с эквимольным количеством ДНК-фрагмента (100 нМ) для образования «закрытого» комплекса на промоторе. Затем к пробам добавляли возрастающие количества 6S РНК (100-2000 нМ) и дополнительно инкубировали при 37°C для установления конкурентного равновесия между НК-лигандами за связывание с активным центром РНКП. Транскрипцию инициировали добавлением смеси четырех NTP, содержащих [α-³²P]УТР, и снова выдерживали при 37°C. После денатурации РНКП (95°C, 5 мин) пробы анализировали в 5%-ном ПААГ,

содержащем 7 М мочевины. В условиях эксперимента добавление каждой из 6S РНК приводило к заметному уменьшению эффективности транскрипции с промоторов генов *rrnB* и *veg* (рис. II.10). Таким образом, обе 6S РНК *B. subtilis* способны специфически ингибировать транскрипцию *in vitro*.

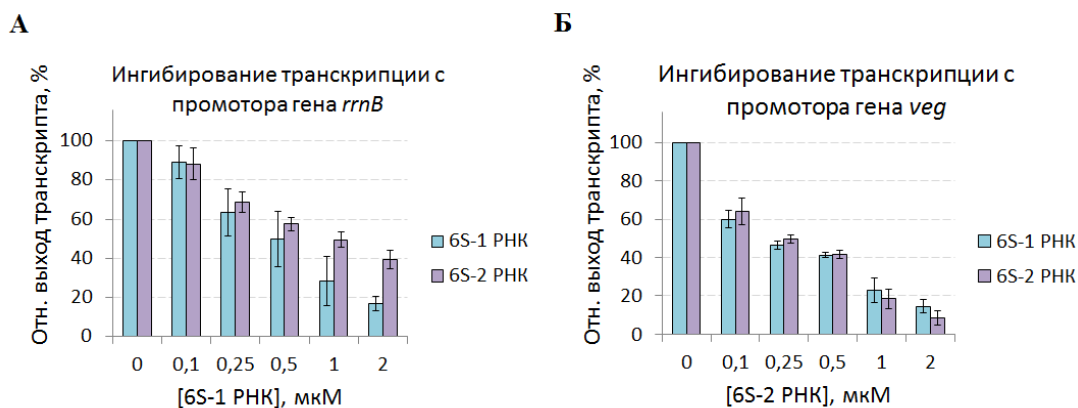


Рис. II.10. Графики зависимости относительного выхода транскрипта с промоторов гена *rrnB* (А) и *veg* (Б) в зависимости от концентрации 6S-1 и 6S-2 РНК (100-2000 нМ). Ф. к.: 100 нМ ДНК, 100 нМ РНКП, 200 мкМ каждого из АТФ, СТР, GTP, 50 мкМ UTP, 0,5 мкКи [α - 32 P]UTP. За 100% принимали уровень транскрипции в отсутствие 6S РНК.

Аналогичные серии экспериментов были проведены при пониженной концентрации нуклеозидтрифосфатов – 50 мкМ каждого из АТФ, СТР, GTP, 12,5 мкМ UTP (рис. II.11). В этих условиях эффективность ингибирования транскрипции в присутствии таких же избытков 6S-1 и 6S-2 РНК существенно возросла (в среднем в 1,5-3 раза) и приблизилась к ~ 100% при максимальной концентрации 6S РНК (дорожки 6 и 13 на рис. II.11А, Б).

Такой эффект можно объяснить существованием равновесия между двумя конкурентными процессами, осуществляемыми РНК-полимеразой, – транскрипцией мРНК на ДНК-матрице и транскрипцией пРНК на матрице 6S РНК. Синтезированная пРНК остается связанной с 6S РНК и вызывает высвобождение РНКП из комплекса 6S РНК:РНКП. При относительно низкой концентрации нуклеозидтрифосфатов (50 мкМ) этот процесс не столь значителен, тогда как её повышение до 200 мкМ вызывает заметное снижение эффективности ингибирования транскрипции, поскольку синтез пРНК приводит к «инактивации» части молекул 6S РНК за счет комплексообразования с ними. Подробнее этот процесс описан в разделе II.5.

Для подтверждения специфичности эффекта ингибирования транскрипции с помощью 6S-1 и 6S-2 РНК эксперименты также проводили в присутствии другой нкРНК - РНК рибонуклеазы Р (РНКазы Р) *B. subtilis* (409 н.о.), которая не способна взаимодействовать с РНКП [141]. Добавление РНК РНКазы Р лишь незначительно ухудшает эффективность транскрипции (дорожки 16-20 на рис. II.11А, Б) по сравнению с ингибирующим эффектом 6S-1 и 6S-2 РНК, главным образом при максимальной

концентрации. Слабое негативное влияние на транскрипцию избытков неспецифических РНК описано в литературе на примере 5S РНК и РНКП *E. coli* [32].

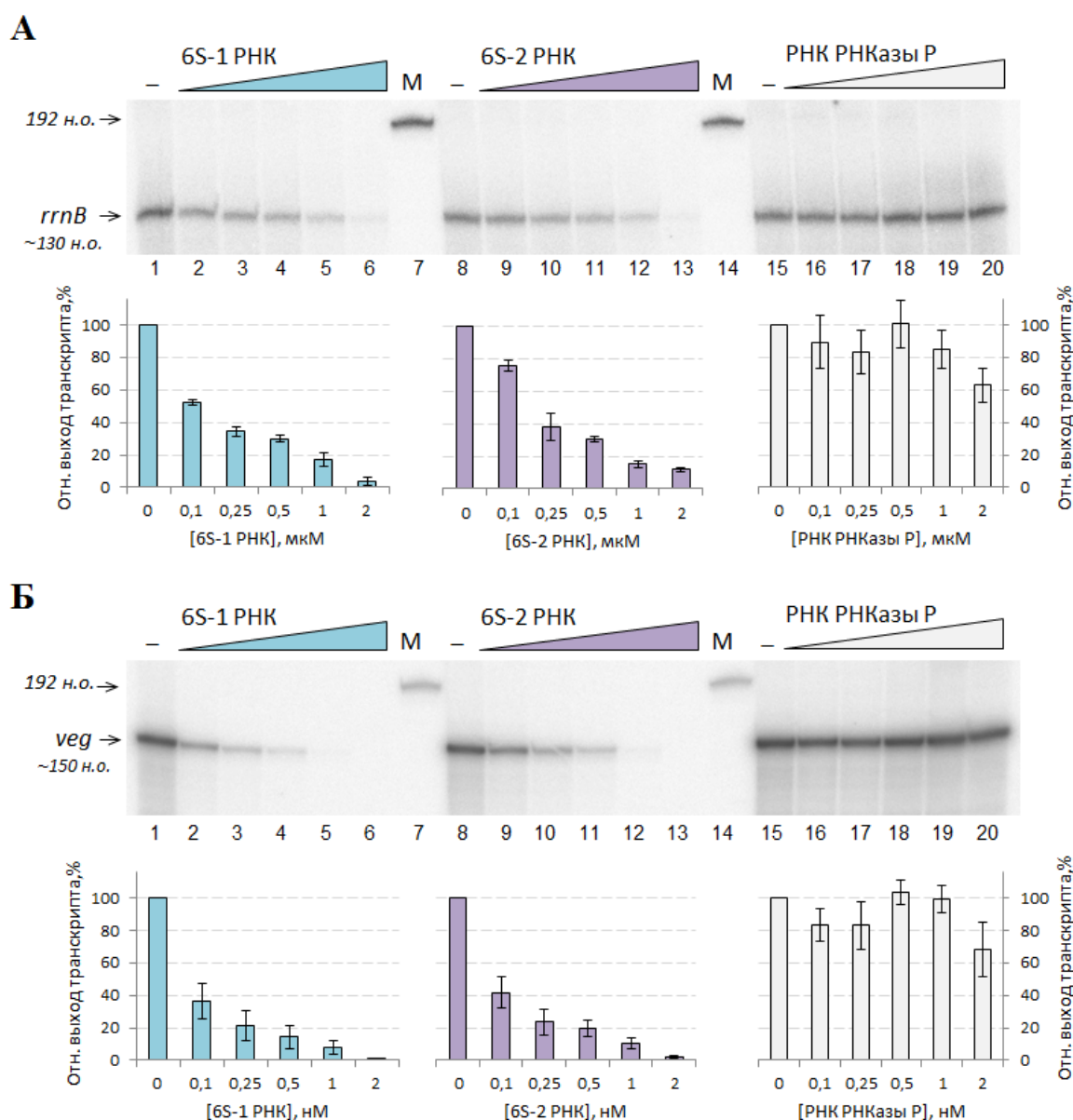


Рис. П.11. Влияние 6S-1 РНК, 6S-2 РНК и РНК РНКазы Р* на транскрипцию с промоторов генов *rrnB* (А) и *veg* (Б) в условиях пониженной концентрации нуклеозидтрифосфатов (50 мкМ каждого из АТФ, СТР, GTP, 12,5 мкМ UTP). Радиоавтографы 5%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины) и соответствующие графики зависимости выходов транскриптов от концентрации РНК. Дорожки 1, 8 и 15 – транскрипция в отсутствие нкРНК; дорожки 2-6, 9-13, 16-20 – транскрипция в присутствии возрастающей концентрации (100-2000 нМ) 6S-1 РНК, 6S-2 РНК или РНК РНКазы Р, соответственно; дорожки 7 и 14 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'-[³²P]-меченная 6S-1 РНК).

* Абсолютные значения интенсивностей радиоактивности продуктов транскрипции в присутствии РНК РНКазы Р иногда превышали интенсивности образца сравнения (т.е. 100%) из-за погрешности эксперимента.

В приведенных выше экспериментах эффективность ингибирования транскрипции с помощью 6S-1 и 6S-2 РНК была сравнительно одинакова для промотора гена *veg*, в то время как транскрипция с промотора гена *rrnB* была немного менее «чувствительна» к

6S-2 РНК. Мы попытались более детально выяснить роль структуры ДНК-промотора в конкуренции с 6S-1 и 6S-2 РНК за связывание с РНКП. Из базы данных по регуляции транскрипции *B. subtilis* DBTBS (Database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis*, <http://dbtbs.hgc.jp/>) [142] были выбраны модельные промоторы, отличающихся нуклеотидными последовательностями -35 и -10 элементов и стартовой точкой транскрипции. Основными критериями отбора являлись наличие экспериментально определенных TSS и промоторных элементов, а также отсутствие дополнительных белков-активаторов, необходимых для транскрипции гена. Кроме того, все рассматриваемые промоторы должны были быть σ^A -зависимыми. В таблице II.1 приведены основные сведения о 5 выбранных промоторах генов *B. subtilis*: *rrnO-16S* (далее *rrnO*), *tuf*, *argC*, *appD*, *cspB*, и об охарактеризованных ранее *rrnB* и *veg* (см. рис. II.8). Также в рассмотрение был взят промотор гена *C2* фага $\phi 29$, инфицирующего *B. subtilis*. Отметим, что основное внимание было уделено именно нуклеотидным последовательностям выбранных промоторов, поэтому функции белков, которые кодируются данными генами, в настоящем исследовании не рассматриваются.

Таблица II.1. Характеристика промоторов генов *B. subtilis*, выбранных для изучения ингибирующей функции 6S-1 и 6S-2 РНК.

Ген	Белок	Промоторные элементы*		Стартовый нуклеотид (+1)
		-35	-12/-10	
<i>rrnB</i>	–	ttgCAa	TG_tataTt	G
<i>veg</i>	Белок с неизвестными функциями	ttgaca	taCaAt	A
<i>rrnO</i>	–	ttgacC	TG_taCTat	G
<i>tuf</i>	Фактор элонгации трансляции eFTu	ttgaTT	tataaC	G
<i>argC</i>	Белок, участвующий в биосинтезе Arg	ttgaAT	TG_tataat	A
<i>appD</i>	Белок с неизвестными функциями	ttgaTT	taATat	A
<i>cspB</i>	Белок холодового шока	ttgTТТ	TG_taGaGt	A
<i>C2ϕ29</i>	Белок C2 бактериофага $\phi 29$	ttgaAa	TG_tataCt	A+T

* Заглавными буквами выделены нуклеотиды, отличающиеся от консенсусных последовательностей -10 и -35 промоторных элементов *B. subtilis*. Индекс d (дезокси) при написании последовательностей ДНК опущен.

Все промоторы, кроме промотора гена *cspB* активны в экспоненциальной фазе роста клетки. Выбор промоторов, активных в стационарной или других фазах роста (например, при споруляции или ответе на стрессовые условия) был затруднен, поскольку транскрипция генов с этих промоторов осуществляется, как правило, холоферментами РНКП, содержащими альтернативные σ -факторы (в первую очередь σ^H) и/или регулируется другими белками. На данный момент в литературе описано существование более 17 различных σ -факторов РНКП, отвечающих за транскрипцию тех или иных

промоторов в клетке *B. subtilis* [143]. В итоге среди восьми используемых в исследовании промоторов пять содержат расширенный -10 элемент. Стартовой точкой транскрипции для четырех из восьми промоторов является остаток dA, и для трех – dG. Промотор гена *C2φ29* фага φ29 содержит две альтернативные стартовые точки транскрипции dA (+1) и dT (+2). Отметим, что в клетках *B. subtilis* 56% всех промоторов содержат остаток dA в +1 положении, 38% - dG, 4,5% – dT и только 1,5% – dC [140]. Методом ПЦР были синтезированы ДНК-фрагменты длиной 220–400 н.п. (табл. II.2), содержащие соответствующие промоторы генов. В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК *B. subtilis* 168. Праймеры для ПЦР подбирали таким образом, чтобы предполагаемая длина продуктов транскрипции с полученных фрагментов ДНК варьировала в пределах ~ 100–230 н.о. для возможности проведения гель-электрофореза в одинаковых условиях.

Таблица II.2. Значения длин ПЦР-фрагментов ДНК и предполагаемых РНК-транскриптов для промоторов различных генов, используемых для изучения ингибирования транскрипции.

Ген	Длина	
	ДНК, н.п.	РНК, н.о.
<i>argC</i>	234	139
<i>appD</i>	310	180
<i>cspB</i>	370	232
<i>C2φ29</i>	268	102/103
<i>tuf</i>	221	120
<i>rrnO</i>	386	132
<i>rrnB</i>	244	131
<i>veg</i>	288	148

Для всех выбранных промоторов наблюдали эффективный синтез РНК-транскриптов в тестовых экспериментах (рис. II.12).

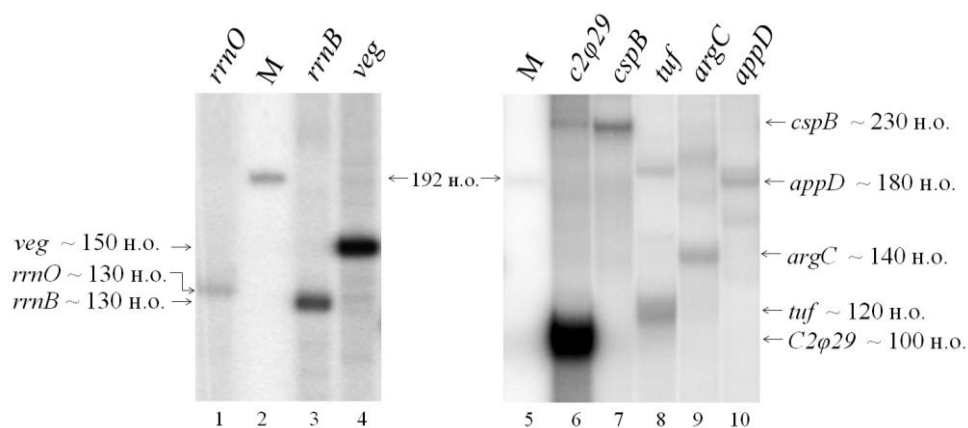


Рис. II.12. Сравнительный анализ длин продуктов транскрипции *in vitro* с промоторов генов *rrnO* (дорожка 1), *rrnB* (дорожка 3), *veg* (дорожка 4), *C2φ29* (дорожка 6), *cspB* (дорожка 7), *tuf* (дорожка 8), *argC* (дорожка 9) и *appD* (дорожка 10). Ф. к.: 200 нМ ДНК, 100 нМ РНКП, 200 мкМ каждого из АТР, СТР, ГТР, 50 мкМ УТР, 0,5 мкКи [α - 32 Р]УТР. Дорожки 2, 5 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'- 32 Р)-меченная 6S-1 РНК). Радиоавтографы 5%-ных ПААГ, содержащих 7 М мочевины.

Расположение соответствующих радиоактивных зон относительно друг друга и маркера длины РНК (192 н.о.) совпадало с теоретически рассчитанными длинами продуктов транскрипции. В некоторых случаях также был замечен синтез более длинных РНК, вероятно, соответствующий неспецифической полноразмерной транскрипции со всего фрагмента ДНК или же обусловленный наличием в последовательностях дополнительных промоторных элементов, не описанных в литературе. Стоит отметить, что фаговый промотор белка C2 (*C2φ29*) демонстрировал наибольшую эффективность транскрипции, поэтому в последующих экспериментах с участием соответствующего фрагмента ДНК в реакционную смесь добавляли в ~ 10 раз меньше [α -³²P]УТР.

На следующем этапе транскрипцию с выбранных промоторов проводили в присутствии 6S-1 РНК, 6S-2 РНК или РНК РНКазы Р *B. subtilis*, как было описано ранее для промоторов генов *rrnB* и *veg*. Для каждого промотора ДНК было проведено не менее 3 независимых экспериментов. На основании усреднённых данных для каждого отдельного промотора были построены диаграммы (рис. II.13). Поскольку эффективность синтеза РНК с промоторов генов *rrnO*, *tuf*, *argC* и *appD* при пониженной концентрации нуклеозидтрифосфатов (50 мкМ каждого из АТР, СТР, GTP, 12,5 мкМ УТР) была чрезвычайно низка, было решено проводить эксперименты в присутствии 200 мкМ каждого из АТР, СТР, GTP и 50 мкМ УТР. Как видно из рис. II.13 увеличение концентрации каждой из 6S РНК приводит к уменьшению выхода транскрипта в случае всех выбранных промоторов ДНК. Низкие концентрации РНК РНКазы Р не влияют на транскрипцию в пределах погрешности эксперимента, однако при добавлении 10–50-кратных избытков по отношению к РНКП наблюдается значительное неспецифическое ингибирование фермента вплоть до 20-50% от исходной активности.

В случае промоторов *argC* и *appD* не было зафиксировано каких-либо заметных отличий в ингибировании транскрипции в присутствии 6S-1 и 6S-2 РНК. Эффективности ингибирования промоторов *cspB* и *rrnO* в пределах значений погрешностей тоже можно считать одинаковыми для обеих 6S РНК. Заметные отличия наблюдались только в случае промоторов *C2φ29* и *tuf* – ингибирующий эффект 6S-2 РНК проявлялся слабее, чем 6S-1 РНК. Аналогичная ситуация была зафиксирована в случае промотора *rrnB* (см. рис. II.10). Для более наглядного представления результатов были построены суммарные графики зависимости относительных выходов транскриптов с каждого из рассматриваемых в работе промоторов от концентрации 6S-1 и 6S-2 РНК (рис. II.14). В случае 6S-1 РНК максимальный эффект ингибирования транскрипции проявлялся для промоторов генов *rrnO* и *tuf* (рис. II.14А), тогда как степени ингибирования транскрипции с остальных промоторов различались незначительно.

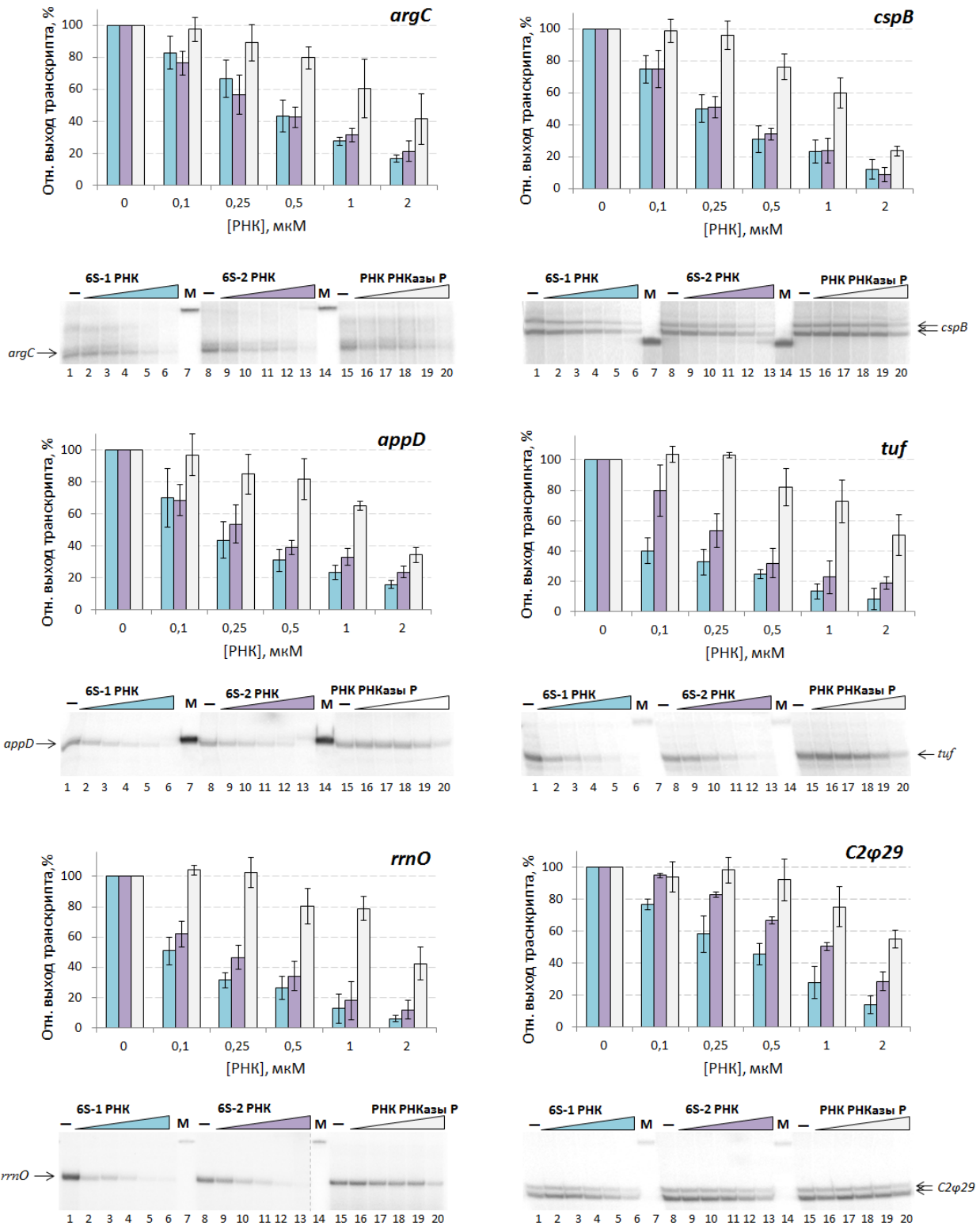


Рис. 11.13. Сравнительный анализ ингибирования транскрипции генов посредством 6S-1 РНК, 6S-2 РНК и РНК РНКазы Р. Под каждым графиком в качестве примера приведен соответствующий радиоавтограф 5%-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины. Дорожки 1, 8, 15 – транскрипция в отсутствие нкРНК. Дорожки 2-6, 9-13, 16-20 – различные концентрации 6S-1 РНК, 6S-2 РНК и РНК РНКазы Р, соответственно: 0,1; 0,25; 0,5, 1 и 2 мкМ. Дорожки 7 и 14 – маркер длины РНК (192 н.о., 5'-[³²P]-меченная 6S-1 РНК). Профили ингибирования для 6S-1 РНК, 6S-2 РНК и РНК РНКазы Р обозначены, соответственно, голубым, фиолетовым и серым цветами.

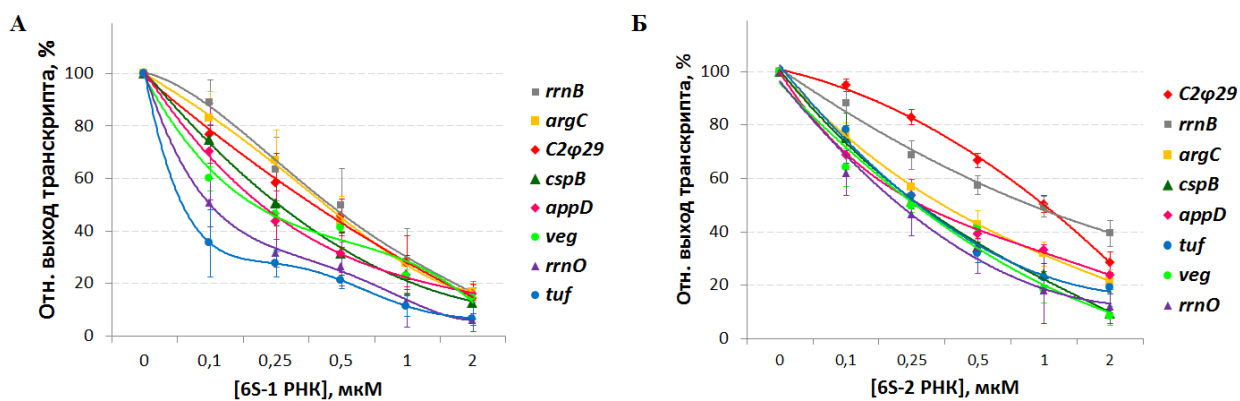


Рис. II.14. Влияние 6S-1 РНК (А), 6S-2 РНК (Б) на транскрипцию с промоторов модельных генов. Графики зависимость относительного выхода транскрипта (%) от концентрации нкРНК в реакционной смеси.

Анализируя результаты транскрипции в присутствии 6S-2 РНК, можно заключить, что эта РНК примерно в одинаковой степени влияет на транскрипцию *in vitro* пяти из рассматриваемых генов независимо от структуры их промоторных элементов. Исключением являются только промоторы *C2φ29* и *rrnB* (рис. II.14Б). То есть обнаруженные отличия в ингибировании в присутствии 6S-1 и 6S-2 РНК связаны с повышенной «чувствительностью» промотора *tuf* к 6S-1 РНК, и пониженной «чувствительностью» *rrnB* и *C2φ29* к 6S-2 РНК. Сопоставляя полученные результаты с нуклеотидными последовательностями промоторных элементов не удалось выявить никаких закономерностей. По всей видимости, все продемонстрированные различия в ингибировании транскрипции 6S-1 и 6S-2 РНК зависят от конкретного промотора и, учитывая погрешность эксперимента, не являются значимыми в рамках глобальной оценки способности обеих 6S РНК препятствовать работе РНК-полимеразы. Подтверждением этому может служить различная «чувствительность» транскрипции с рассматриваемых промоторов в присутствии возрастающих количеств РНК РНКазы Р – то есть даже в случае неспецифического ингибирования. Известно, что РНКП в определенных условиях может неспецифически связывать любую ДНК и РНК [44]. Обычно данная проблема решается добавлением значительных избытков гепарина – неспецифического конкурента НК-лигандов [32]. В наших экспериментах также использовался гепарин, однако, при добавлении больших избытков РНК, концентрация отрицательно заряженных лигандов, видимо, становилась слишком велика, что частично блокировало активность РНКП. Таким образом, не удалось выявить никаких статистически значимых отличий в чувствительности проанализированных промоторов к ингибированию транскрипции в присутствии 6S-1 и 6S-2 РНК. Тем не менее, впервые было продемонстрировано, что обе 6S РНК *B. subtilis* могут специфически ингибировать транскрипцию генов в системе *in vitro*.

II.5. Особенности взаимодействия РНКП с 6S-1 и 6S-2 РНК: синтез пРНК

В 2006 г. в научной группе проф. Вассерман [3] было впервые установлено, что 6S РНК *E. coli* может служить матрицей для синтеза РНК-полимеразой коротких транскриптов длиной от 14 до 24 н.о., названных пРНК (раздел I.2.2.3 в главе «Обзор литературы»). Позднее две пРНК, комплементарные 6S РНК, длиной 12 и 17 н.о. были обнаружены в клетках *H. pylori* [55], а в 2012 г. синтез 32-звенной пРНК был продемонстрирован для 6S РНК *Synechocystis sp.* PCC 6803 [59]. Транскрипция РНК на РНК-матрице нехарактерна для ДНК-зависимой РНК-полимеразы и, как следствие, является исключительной особенностью фермента, наблюдаемой в случае 6S РНК. Поэтому важной задачей данного исследования была проверка возможности транскрипции пРНК на матрицах 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*. Для этих целей комплексообразование каждой из 6S РНК с холоферментом РНКП *B. subtilis* проводили в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Продукты транскрипции анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. В присутствии 6S-1 РНК наблюдали синтез ряда олигорибонуклеотидов длиной до 14-16 н.о., причем 14-звенные варианты пРНК_{6S-1} транскрибировались с максимальной эффективностью (рис. II.15, дорожка 3). В случае 6S-2 РНК также была зафиксирована транскрипция ряда коротких транскриптов длиной от 6 до 16 н.о. и более. Максимальный выход транскрипции в этом случае наблюдали для 13-16-звенных продуктов (рис. II.15, дорожка 4).

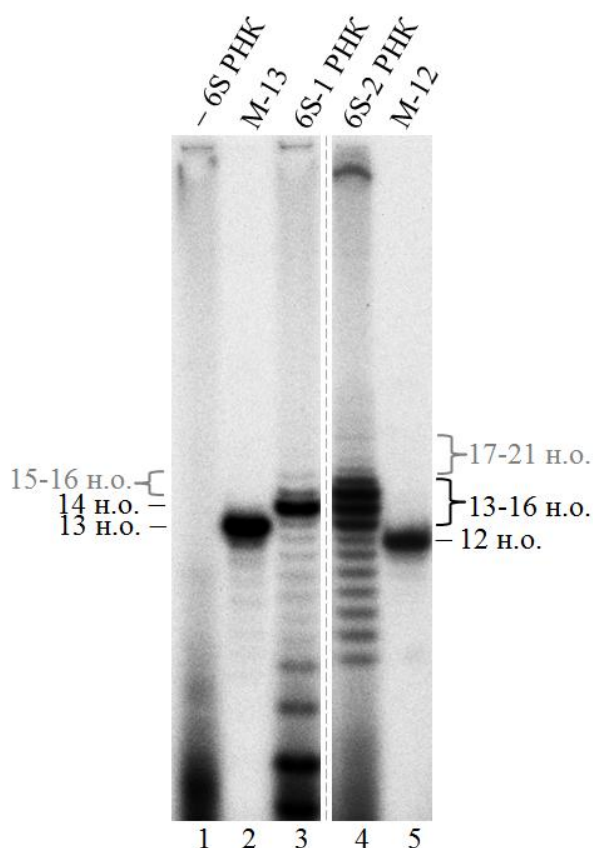


Рис. II.15. Результаты транскрипции *in vitro* на матрице 6S-1 РНК (дорожка 3) и 6S-2 РНК (дорожка 4). Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 200 мкМ 4×NTP*, 0,5 мкКи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Дорожки 2 и 5 – маркеры длины РНК, 5'- ^{32}P -меченные олигорибонуклеотиды длиной 13 н.о. и 12 н.о.**; соответственно. Дорожка 1 – реакция в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Радиоавтограф 25%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

*Для исключения влияния различий в концентрациях NTP на выход пРНК все эксперименты вне зависимости от используемого ^{32}P -меченного NTP проводили в присутствии эквимольных концентраций АТР, СТР, GTP и UTP (если не указано иное).

** Продукты транскрипции из-за содержания трёх фосфатных групп на 5'-конце РНК, характеризуются меньшей подвижностью в ПААГ по сравнению с синтетическими 5'- ^{32}P -мечеными олигорибонуклеотидами той же длины.

Для определения природы стартового нуклеотида в 6S-1 и 6S-2 РНК аналогичные эксперименты проводили в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ¹⁹, поскольку только первый из встраиваемых РНК-полимеразой нуклеозидтрифосфатов не гидролизуется с отщеплением пирофосфата с 5'-конца. Было установлено, что синтез пРНК на 6S-1 РНК начинается с остатка G (рис. П.16А, дорожка 4), а синтез пРНК на 6S-2 РНК – с остатка А (рис. П.16Б, дорожка 3).

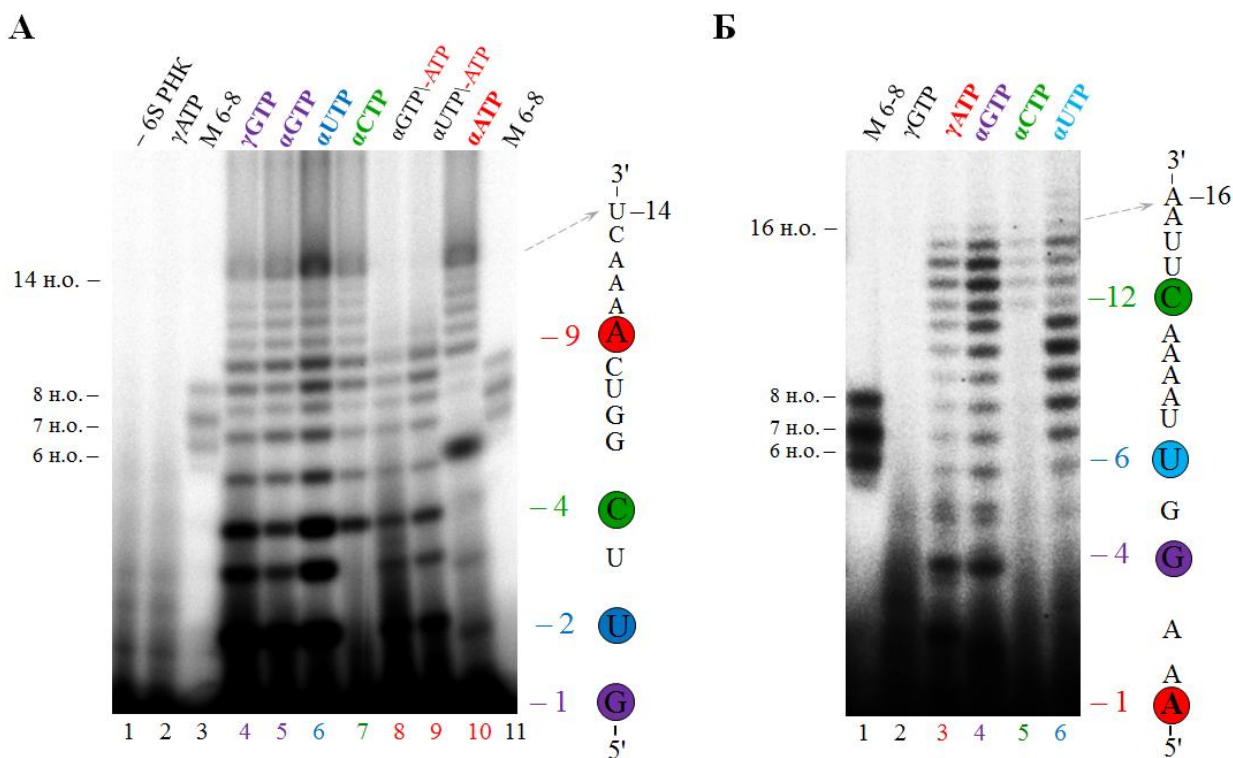


Рис. П.16. Определение нуклеотидных последовательностей пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} в ходе транскрипции *in vitro* в присутствии различных $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -меченных нуклеозидтрифосфатов. (А) Результаты транскрипции *in vitro* на матрице 6S-1 РНК (1 мкМ). Дорожка 1 – транскрипция в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Дорожки 3 и 11 – маркер длин РНК, смесь 5'- $[\text{}^{32}\text{P}]$ -меченных олигорибонуклеотидов длиной 6, 7 и 8 н.о. Дорожки 2 и 4 – транскрипция в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, соответственно. Дорожки 5, 6, 7 и 10 – транскрипция в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, соответственно. Дорожки 8 и 9 – транскрипция в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, соответственно, при одновременном отсутствии АТР. (Б) Результаты транскрипции *in vitro* на матрице 6S-2 РНК (1 мкМ). Дорожка 1 – маркер длин РНК. Дорожки 2 и 3 – транскрипция в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, соответственно. Дорожки 4, 5 и 6 – транскрипция в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, соответственно. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 200 мкМ 4×NTP. Радиоавтографы 25%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Справа указаны установленные нуклеотидные последовательности пРНК. Нуклеотиды, положение которых было определено по результатам эксперимента, выделены цветом, соответствующим цвету того или иного $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - или $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$.

¹⁹ Как правило, транскрипция в клетках *B. subtilis* начинается с остатка А или G. Для проверки возможности старта транскрипции с остатков U и C, аналогичные эксперименты проводили в присутствии $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ и $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$. В обоих случаях синтез $[\text{}^{32}\text{P}]$ -меченных продуктов транскрипции не был зафиксирован (как для 6S-1 РНК, так и для 6S-2 РНК, данные не приведены).

Для установления нуклеотидных последовательностей пРНК транскрипцию проводили также в присутствии различных [α - 32 P]-меченных нуклеозидтрифосфатов, при этом длина первого из детектируемых транскриптов указывала на положение встраиваемого нуклеотида в цепи полноразмерной пРНК. Например, при использовании [α - 32 P]СТР первый детектируемый продукт транскрипции с 6S-1 РНК представляет собой 4-звенный олигорибонуклеотид (рис. II.16А, дорожка 7). Следовательно, первый остаток С, который встречается в последовательности пРНК_{6S-1}, является четвертым по счету нуклеотидом. В случае пРНК_{6S-2} первый остаток С расположен в позиции 12, так как при автордиографии детектируются только транскрипты, длина которых составляет 12 и более н.о. (рис. II.16Б, дорожка 5). Аналогичное соотнесение было проведено для остатков G и U. Незначительные трудности возникли при определении положения первого по счету остатка А в последовательности пРНК_{6S-1}, поскольку при использовании [α - 32 P]АТР появлялся неспецифический сигнал, соответствующий ~ 5-звенному продукту транскрипции. Тем не менее наиболее интенсивным из первых детектируемых продуктов специфической транскрипции в присутствии [α - 32 P]АТР являлся 9-звенный вариант пРНК_{6S-1}. Косвенно полученный результат подтверждается экспериментами по транскрипции в отсутствие АТР (рис. II.16А, дорожки 8 и 9). В этом случае транскрипция останавливалась, главным образом, после каталитического присоединения 9-го и частично после 10-го нуклеотидов в цепи пРНК. Известно, что РНКП обладает способностью неспецифически добавлять 1-2 н.о. с 3'-конца синтезирующейся РНК в отсутствие необходимого субстрата²⁰. Так как после 9-го остатка А в последовательности пРНК следуют еще три остатка аденозина, вероятность для РНКП «проскочить» такой участок и продолжить синтез комплементарной РНК крайне мала, поэтому происходит терминация транскрипции.

Таким образом в результате проведенных экспериментов были определены 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 такому расположению нуклеотидов относительно друг друга. Транскрипция обеих пРНК начиналась внутри центральной петли и продолжалась в сторону 5'-конца 6S-1 или 6S-2 РНК (рис. II.17), аналогично тому, как это обнаружено для 6S РНК *E. coli*. Интересно, что нуклеотидные последовательности пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} содержат два идентичных участка 5'-GGU-3' и 5'-AAAACU-3', разделенных одним н.о.

²⁰ В условиях *in vivo* добавление некомплементарного ДНК-матрице нуклеотида с 3'-конца синтезирующейся цепи РНК приводит к остановке транскрипции. Процесс восстанавливается с помощью факторов элонгации Gre, удаляющих некомплементарный нуклеотид [144].

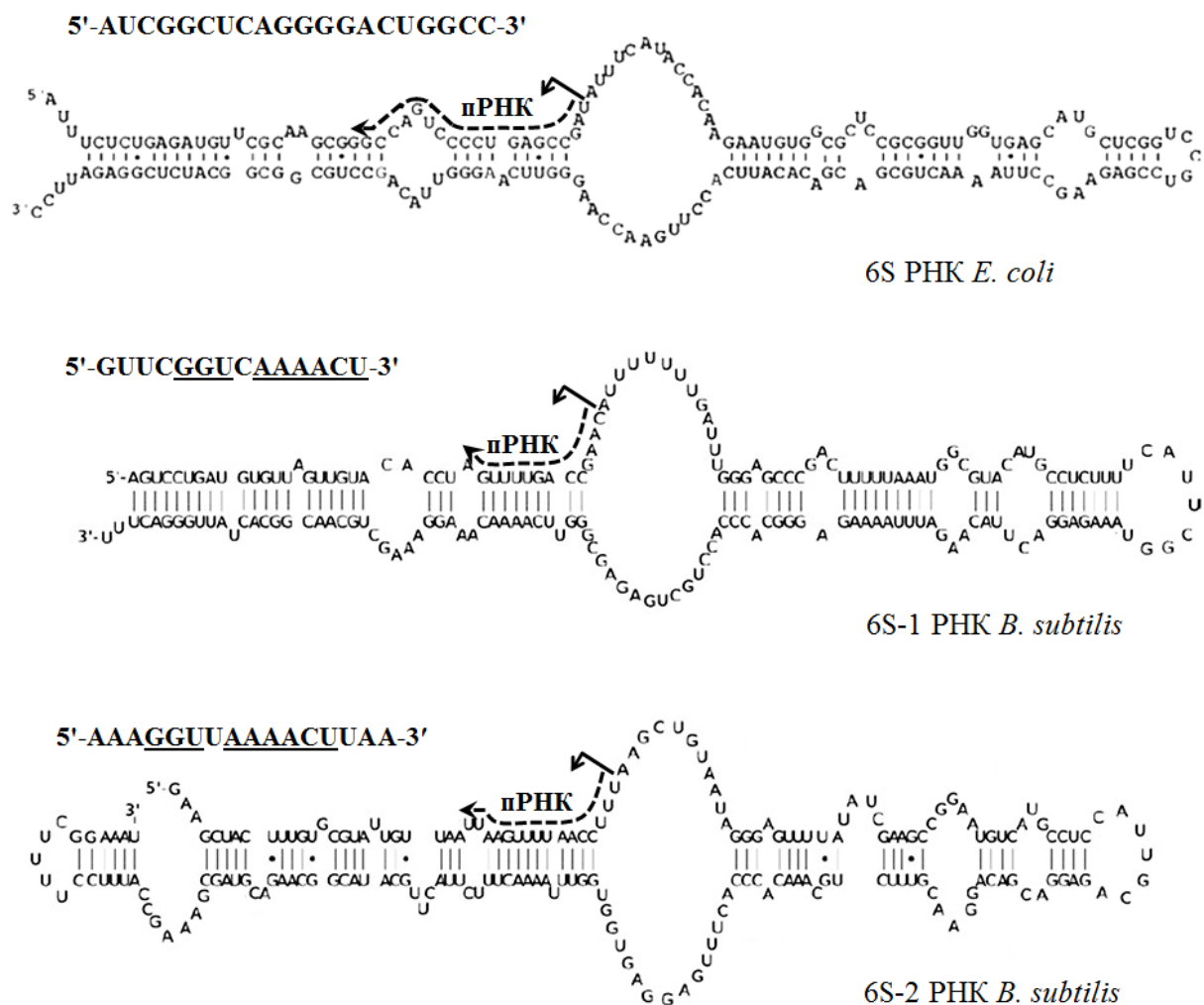


Рис. II.17. Нуклеотидные последовательности и относительное расположение пРНК, синтезируемых РНКП с 6S РНК *E. coli* и 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*. Стартовые точки транскрипции отмечены тонкими стрелками, направление синтеза пРНК – прерывистой линией со стрелкой. Гомологичные участки пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} подчеркнуты.

Для подтверждения состава установленных нуклеотидных последовательностей пРНК продукты транскрипции *in vitro* с 6S-1 и 6S-2 РНК анализировали методом блот-гибридизации в варианте Нозерн, используя в качестве зондов к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} синтетические олигодезоксирибонуклеотиды заданной первичной структуры с включениями остатков ковалентно замкнутых нуклеозидов (LNA, «locked nucleic acid»). Введение остатков LNA в состав олигонуклеотида существенно повышает стабильность образующихся в результате гибридизации ДНК-пРНК дуплексов²¹, что позволяет с высокой чувствительностью детектировать короткие олигорибонуклеотиды длиной порядка 10 н.о. [145]. Для последующей иммунодетекции к 5'-концу синтетических зондов ковалентно присоединяли остаток диоксигенина (DIG) (рис. II.18). В качестве положительных контролей использовали синтетические олигорибонуклеотиды длиной 14 н.о. (p14_{6S-1}) и 12 н.о. (p12_{6S-2}), идентичные определенным последовательностям пРНК_{6S-1}

²¹ Метиленовый мостик, соединяющий 2'-О и 4'-С атомы рибозы в бициклических аналогах нуклеозидов обеспечивает стабильную β-D-конформацию сахара.

и пРНК_{6S-2} (см. табл. III.9 в главе «Экспериментальная часть»). Как видно из рис. II.18, продукты транскрипции с обеих 6S РНК специфически гибридизовались с синтетическими зондами, что доказывает правильность установленных нуклеотидных последовательностей пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}.

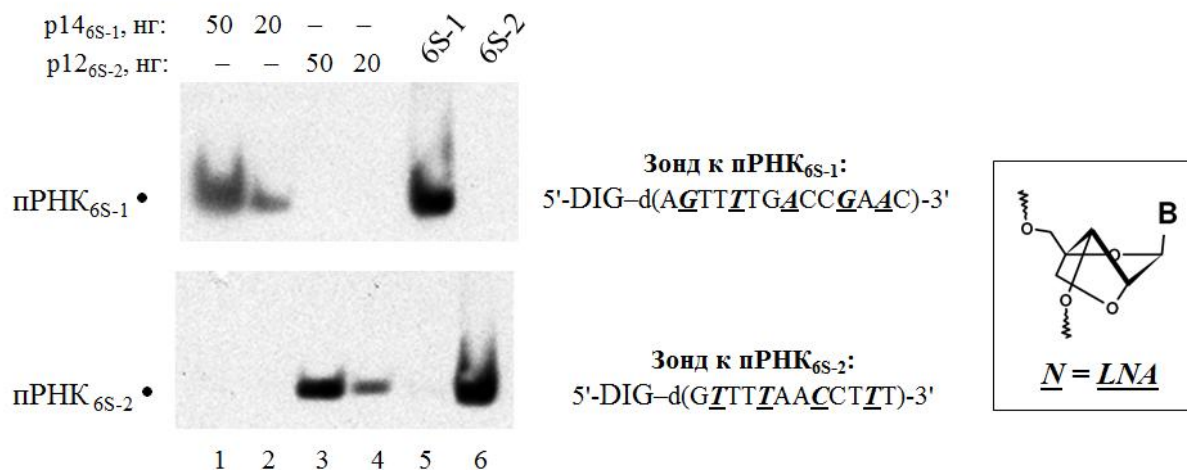


Рис. II.18. Результаты блот-гибридизации продуктов транскрипции (Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 200 мкМ 4×NTP) с 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* (дорожки 5 и 6, соответственно). Дорожки 1-2 и 3-4 – синтетические олигорибонуклеотиды, аналоги пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}, соответственно, длиной 14 н.о. и 12 н.о. (положительные контроли). Последовательности зондов, используемых для гибридизации, указаны справа. Остатки ковалентно замкнутых нуклеозидов выделены жирным шрифтом и курсивом и подчеркнуты. DIG – остаток дигоксигенина.

Непосредственно синтез пРНК на матрице 6S РНК не является функционально значимым для процесса ингибирования транскрипции. Главным свойством пРНК является способность к образованию комплекса с 6S РНК и последующая потеря сродства такого комплекса к РНКП. Следовательно, необходимо было показать возможность формирования комплексов 6S РНК:пРНК. Для этого изучали взаимодействие 5'-[³²P]-меченных 6S РНК с РНКП в присутствии смеси нуклеозидтрифосфатов. Продукты реакции анализировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. II.19). Для предотвращения неспецифических взаимодействий 6S РНК и РНКП в реакционную смесь добавляли гепарин (40 нг/мкл). В отсутствие нуклеозидтрифосфатов детектировались только комплексы 6S РНК:РНКП и «свободные» 6S РНК (рис. II.19А, Б, дорожки 1). При добавлении четырех NTP (200 мкМ каждого) как в случае 6S-1 РНК²², так и в случае 6S-2 РНК, наблюдали появление дополнительной радиоактивной зоны, характеризующейся меньшей подвижностью в геле по сравнению со «свободными» 6S РНК (рис. II.19А, Б, дорожки 2-7). Для корректного соотнесения радиоактивных зон в качестве положительных контролей использовали предварительно образованные

²² Эксперимент с 6S-1 РНК проводился асп. Ф. Хохом под руков. проф. Р. Хартманна (Институт фармацевтической химии, Марбургский университет имени Филиппа, Германия) и опубликован ранее в работе [146]. Радиоавтограф геля (рис. II.19А) размещен с разрешения Ф. Хоха и Р. Хартманна для сравнительного анализа 6S-1 и 6S-2 РНК.

комплексы 6S-1 и 6S-2 РНК с синтетическими олигорибонуклеотидами – аналогами пРНК длиной 14 н.о. (p14_{6S-1}) и 15 н.о. (p15_{6S-2}), соответственно. Вероятность образования дуплекса между пРНК и 6S РНК в растворе довольно мала в отличие от ситуации, когда РНКП синтезирует пРНК непосредственно на матрице 6S РНК. Поэтому для формирования «искусственного» комплекса вначале разрушали вторичную структуру 6S РНК, нагревая реакционную смесь до 95°C, а затем проводили её ренатурацию в присутствии избытка соответствующего олигорибонуклеотида, ступенчато охлаждая реакционную смесь до 37°C. Скорость миграции «искусственно» полученных комплексов 6S РНК:пРНК (рис. II.19А, дорожка 10; рис. II.19Б, дорожка 9) соответствовала скорости миграции комплексов, образующихся при транскрипции пРНК на 6S РНК. Таким образом в результате транскрипции как с 6S-1 РНК, так и с 6S-2 РНК, синтезированные пРНК-транскрипты остаются связанными с соответствующими 6S РНК, образуя комплекс 6S РНК:пРНК.

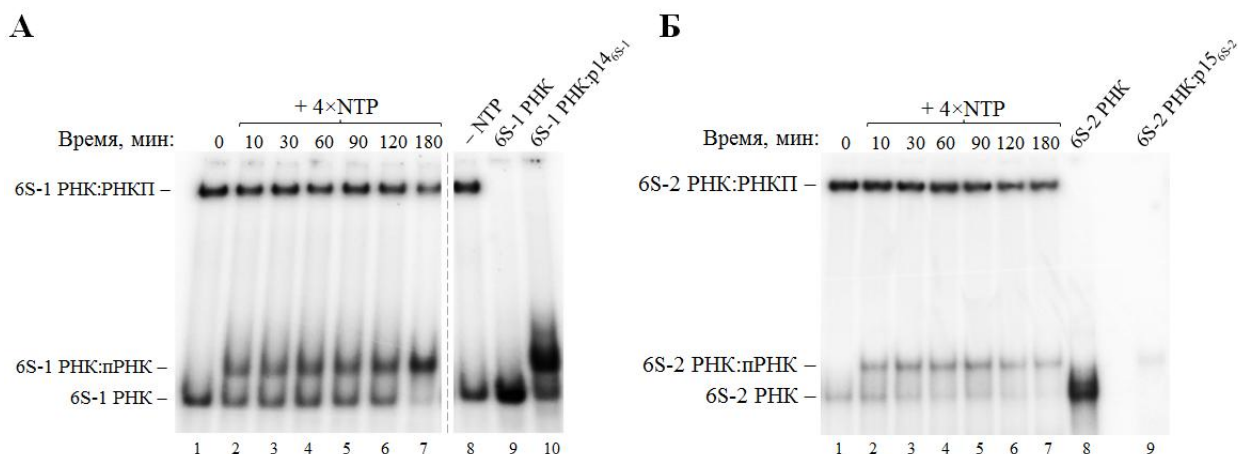


Рис. II.19. Анализ комплексообразования 5'-[³²P]-меченных 6S-1 РНК (А) и 6S-2 РНК (Б) с холоферментом РНКП в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов (200 мкМ). (А) Дорожки 1 и 8 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-1 РНК (1 мкМ) в отсутствие NTP после инкубации при 37°C в течение 30 мин и 180 мин, соответственно. Дорожки 2-7 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-1 РНК (1 мкМ) в присутствии 4xNTP после инкубации при 37°C в течение 10-180 мин. Дорожка 9 – исходная 6S-1 РНК. Дорожка 10 – комплекс 5'-[³²P]-меченной 6S-1 РНК (1 мкМ) с синтетическим аналогом пРНК_{6S-1} (10 мкМ) длиной 14 н.о. (p14_{6S-1}) [146]. (Б) 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 4xNTP 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}). Радиоавтографы 7,5%-ных ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Как видно из рис. II.19, через 180 мин после начала транскрипции большая часть «свободной» 6S-1/6S-2 РНК оказывается в комплексе с пРНК (рис. II.19А, Б, дорожки 7), в то же время степень связывания 6S РНК с РНКП немного уменьшается и составляет ~ 80% по сравнению с исходной степенью связывания до добавления NTP (рис. II.19А, Б, дорожки 1). Это свидетельствует о частичном высвобождении РНКП из комплекса с 6S-1 или 6S-2 РНК после синтеза пРНК. На основании полученных результатов можно сделать

вывод, что принцип взаимодействия РНКП с обеими 6S РНК *B. subtilis* одинаков, и соответствует существующей на данный момент теоретической модели, разработанной для системы *E. coli* (раздел I.2.2.3 в главе «Обзор литературы»).

Анализ комплексообразования РНКП с 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК через короткое время (1-5 мин) после начала инкубации с нуклеозидтрифосфатами позволил выявить интересный факт. На начальных этапах синтеза пРНК образование комплекса 6S-2 РНК:пРНК приводит к уменьшению фракции комплекса 6S-2 РНК:РНКП до 20% по сравнению с исходной (рис. П.20А, дорожка 3), однако после 10 мин от начала транскрипции степень связывания 6S-2 РНК с РНКП вновь начинает увеличиваться до ~ 40% от исходной (рис. П.20А, дорожка 6).

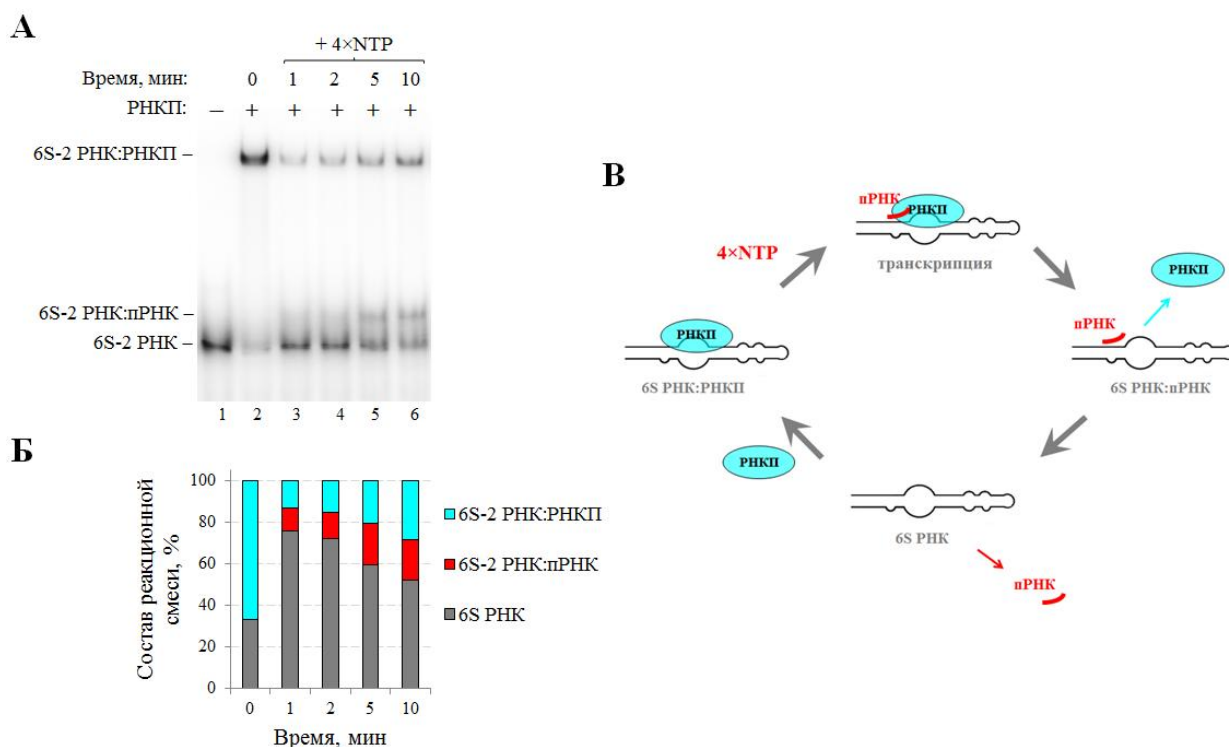


Рис. П.20. Анализ комплексообразования 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК с холоферментом РНКП в присутствии 4×NTP (200 мкМ) после 1-10 мин от начала синтеза пРНК. (А) Радиоавтограф 5%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Дорожка 1 – исходная 6S-2 РНК, дорожка 2 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-2 РНК (1 мкМ) в отсутствие NTP после инкубации при 37°C в течение 15 мин. Дорожки 2-6 – комплексообразование РНКП (2 мкМ) с 6S-2 РНК (1 мкМ) в присутствии 200 мкМ 4×NTP после инкубации при 37°C в течение 1-10 мин. (Б) Диаграмма процентного состава реакционной смеси в зависимости от времени инкубации с NTP. (В) Схематичное представление эксперимента.

Результаты количественного анализа относительных интенсивностей радиоактивности «свободной» 6S-2 РНК и её комплексов с пРНК и РНКП приведены на рис. П.20Б. Полученные результаты могут быть объяснены низкой стабильностью комплексов 6S-2 РНК с синтезируемыми *de novo* пРНК. В присутствии смеси нуклеозидтрифосфатов РНКП в комплексе с 6S-2 РНК начинает синтезировать пРНК, что приводит к эффективному высвобождению фермента (время инкубации < 1 мин). Однако

большая часть образующихся дуплексов 6S-2 РНК:пРНК диссоциирует в растворе и свободная 6S-2 РНК вновь связывается с РНКП, затем цикл повторяется и доля дуплексов 6S-2 РНК:пРНК постепенно увеличивается (рис. II.20В). Это объясняет низкую эффективность (менее 20%) вытеснения РНКП из комплекса с 6S РНК в аналогичных экспериментах в условиях длительной (в течение 3 ч) инкубации реакционной смеси с 4×NTP (рис. II.19). Исследования эффективности комплексообразования РНКП с 6S-1 РНК через короткое время после начала инкубации с нуклеозидтрифосфатами не проводились.

На следующем этапе работы сравнили эффективности синтеза пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. Транскрипцию проводили в присутствии возрастающих количеств 6S РНК, используя в качестве радиоактивной метки [α -³²P]UTP для 6S-1 РНК и [α -³²P]АТР для 6S-2 РНК. Это позволяло в обоих случаях после электрофореза в 25%-ном ПААГ в денатурирующих условиях детектировать транскрипты длиной от 2 н.о. (рис. II.21). Отметим, что в случае 6S-1 РНК наблюдали появление незначительного количества 15- и 16-звенных пРНК, однако преобладающим транскриптом являлась пРНК длиной 14 н.о.

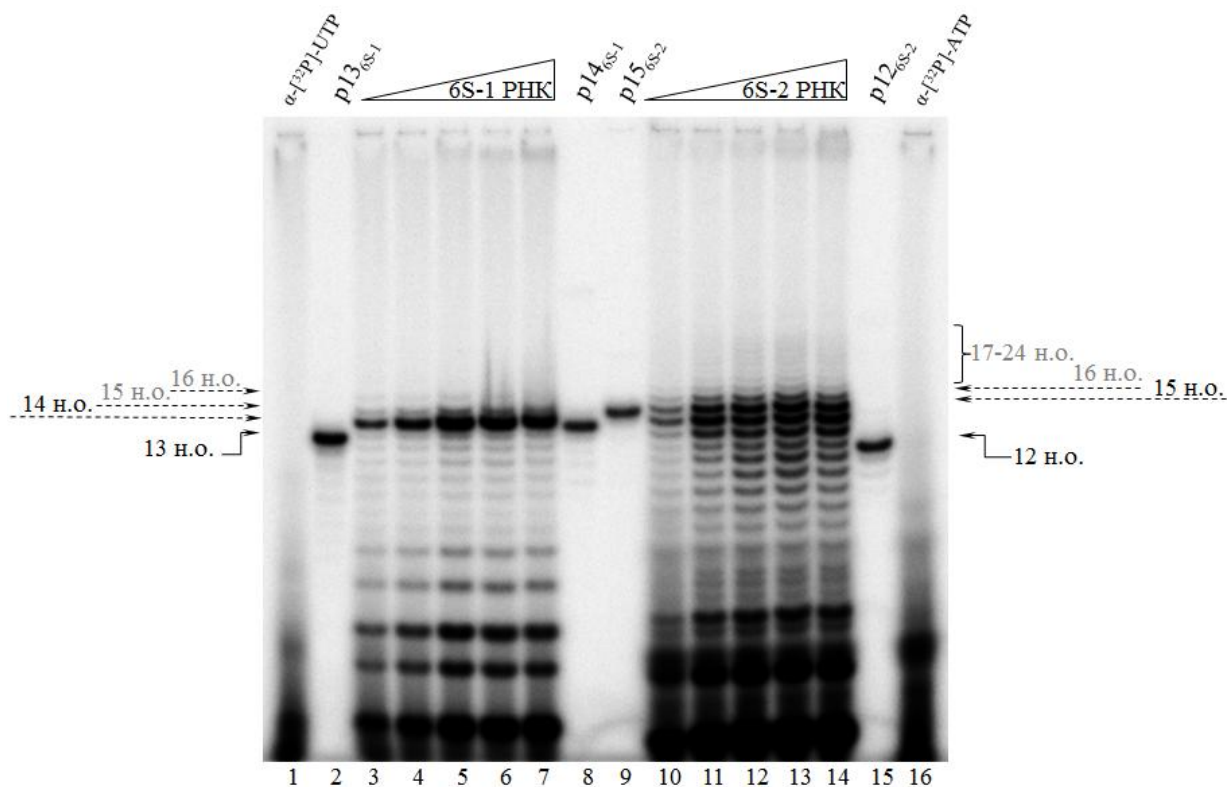


Рис. II.21. Анализ продуктов транскрипции – пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} – в присутствии возрастающих количеств 6S-1 и 6S-2 РНК. Дорожки 1 и 16 – транскрипционные смеси в отсутствие 6S РНК (отрицательные контроли). Дорожки 2, 8 и 9, 15 – маркеры длин РНК, 5'-[³²P]-меченные синтетические олигорибонуклеотиды – аналоги пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}, длиной 13 н.о. (p13_{6S-1}), 14 н.о. (p14_{6S-1}), 15 н.о. (p15_{6S-2}), и 12 н.о. (p12_{6S-2}). Дорожки 3-7 и 10-14 – транскрипция в присутствии возрастающих количеств 6S-1 РНК и 6S-2 РНК, соответственно (0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ). Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 200 мкМ 4×NTP. Радиоавтографы 25%-ного ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

В случае 6S-2 РНК 13-16-звенные пРНК синтезировались со сравнимой эффективностью, а при высоких концентрациях 6S-2 РНК удалось детектировать образование и более протяженных продуктов транскрипции длиной до ~ 24 н.о. На основании обсчета интенсивностей радиоактивных зон, соответствующих транскриптам длиной 10-16 н.о., с учетом количества потенциально радиоактивных остатков U или A в последовательности (данные не приведены), был сделан вывод, что обе пРНК транскрибируются с примерно одинаковой эффективностью.

При анализе тех же транскрипционных смесей методом электрофореза в 7%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях, было установлено, что в условиях эксперимента процент образовавшегося комплекса 6S-2 РНК:пРНК_{6S-2} по сравнению с комплексом 6S-1 РНК:пРНК_{6S-1} крайне низок, хотя и увеличивается при возрастании концентрации 6S-2 РНК (рис. II.22). Отметим, что радиоактивную метку (остаток [α -³²P]U или [α -³²P]A) содержали только продукты транскрипции – пРНК и их комплексы с 6S РНК.

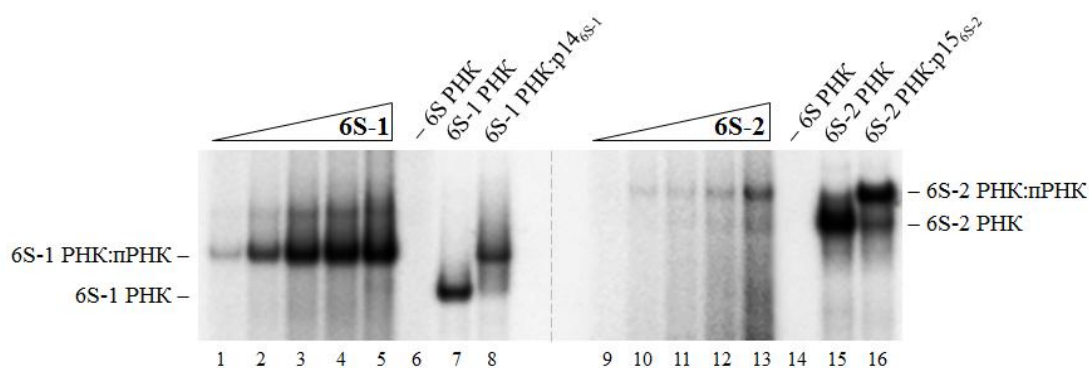


Рис. II.22. Анализ продуктов транскрипции – пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} – в присутствии возрастающих количеств 6S-1 и 6S-2 РНК методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях. Дорожки 1-5 и 9-13 – транскрипция в присутствии возрастающих количеств, соответственно, 6S-1 РНК и 6S-2 РНК (0,1 мкМ; 0,5 мкМ; 1 мкМ; 2 мкМ; 5 мкМ). Ф. к: 1 мкМ РНКП; 200 мкМ 4×NTP. В качестве радиоактивной метки использовали [α -³²P]УТР для 6S-1 РНК и [α -³²P]АТР для 6S-2 РНК. Дорожки 6 и 14 – транскрипционные смеси в отсутствие 6S РНК с [α -³²P]УТР и [α -³²P]АТР, соответственно (отрицательные контроли). Дорожки 7 и 15 – 5'-[³²P]-меченные 6S-1 и 6S-2 РНК, соответственно. Дорожка 8 – предварительно сформированный комплекс 5'-[³²P]-меченной 6S-1 РНК (2 мкМ) с синтетической пРНК_{6S-1} длиной 14 н.о. (20 мкМ, р14_{6S-1}). Дорожка 16 – предварительно сформированный комплекс 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК (2 мкМ) с синтетической пРНК_{6S-2} длиной 15 н.о. (20 мкМ, р15_{6S-2}). Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза.

Полученные результаты не согласовались с данными о примерно одинаковых выходах *de novo* синтезированных пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} (рис. II.21). Однако в ходе транскрипции РНКП синтезирует целый ряд пРНК длиной от 2 до как минимум 14 н.о. в случае 6S-1 РНК и до 16 н.о. в случае 6S-2 РНК. В системе *E. coli* было установлено, что только пРНК длиной более 9 н.о. могут образовывать стабильный комплекс с 6S РНК, а синтез олигорибонуклеотидов длиной более чем 14 н.о. приводит к высвобождению РНКП из её комплекса с 6S РНК [147]. Очевидно, что стабильность комплексов 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* с соответствующими пРНК разной длины тоже должна быть

различной. Кроме того, из-за отличия нуклеотидных последовательностей эффективность гибридизации пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} одинаковой длины с 6S-1 и 6S-2 РНК, соответственно, может существенно различаться. С помощью программы «RNAcofold» были предсказаны величины энергии Гиббса (ΔG°) образования дуплексов между пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} различной длины и комплементарными им участками в 6S-1 и 6S-2 РНК (рис. II.23).

Оказалось, что лишь 20-звенный вариант пРНК_{6S-2} может образовывать с 6S-2 РНК дуплекс, сходный по стабильности с дуплексом 14-звенной пРНК_{6S-1} с 6S-1 РНК, тогда как дуплексы 6S-2 РНК с более короткими пРНК_{6S-2} характеризуются большими значениями ΔG° . Действительно, нуклеотидная последовательность пРНК_{6S-2} является значительно более А,У-богатой (~ 85%) по сравнению с пРНК_{6S-1} (~ 55%), что, вероятно, приводит к низкой стабильности комплексов 6S-2 РНК:пРНК_{6S-2}. То есть подавляющее большинство синтезирующихся с матрицы 6S-2 РНК транскриптов, вероятно, не способно оставаться в комплексе с молекулой РНК.

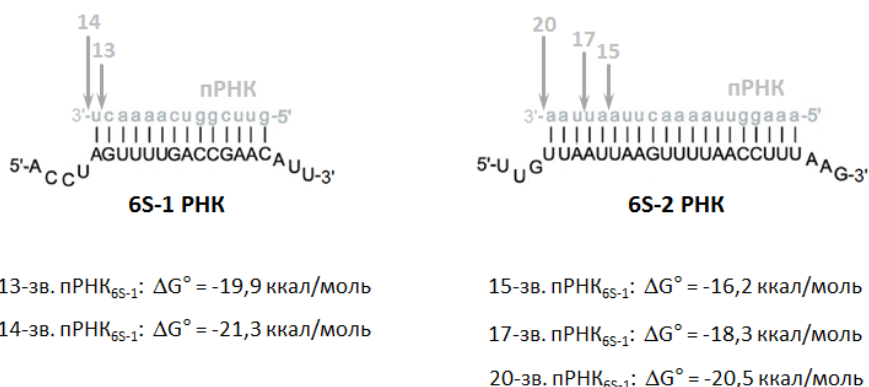


Рис. II.23. Стабильность дуплексов 6S-1 и 6S-2 РНК с соответствующими пРНК различной длины. Значения минимальной свободной энергии образования РНК-РНК дуплексов (ΔG°) оценены с помощью программы «RNAcofold» (<http://rna.tbi.univie.ac.at>) [148].

Для проверки теоретических данных, в первую очередь было изучено взаимодействие 6S-2 РНК с 5'-[³²P]-меченными синтетическими пРНК длиной 12-16 н.о. и 20 н.о. Эти эксперименты позволили выяснить «критическую» длину пРНК, необходимую для образования стабильного комплекса с 6S-2 РНК. Для сравнения аналогичные эксперименты провели и для 6S-1 РНК, используя пРНК длиной 12-14 и 20 н.о. Формирование дуплексов проводили путем ступенчатого «отжига» двукратного избытка синтетического олигорибонуклеотида на матрице 6S РНК.

Как и ожидалось, эффективность образования дуплексов 6S РНК:пРНК прямо пропорционально зависела от длины пРНК, причем комплексы 6S-1 РНК отличались большей стабильностью по сравнению с комплексами для 6S-2 РНК, формируемыми пРНК одинаковой длины (рис. II.24). Методом «торможения в геле» показано, что 12- и 13-звенные пРНК_{6S-2} практически неспособны образовывать дуплекс с 6S-2 РНК, а с

увеличением длины пРНК степень их связывания с 6S-2 РНК возрастает (рис. П.24Б). Аналогичная тенденция наблюдалась и для пРНК_{6S-1}, причем комплекс 6S-1 РНК с наиболее короткой 12-звенной пРНК_{6S-1} уже был стабилен и детектировался при автордиографии (рис. П.24А).

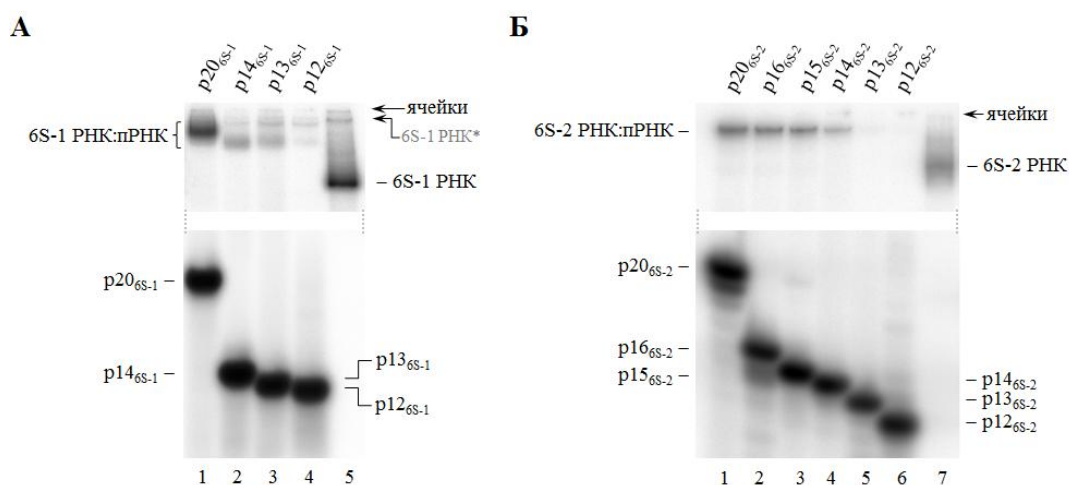


Рис. П.24. Влияние длины синтетических пРНК на стабильность комплексов 6S-1 РНК:пРНК (А) и 6S-2 РНК:пРНК (Б). (А) Дорожки 1-4 – образование комплексов 6S-1 РНК (1 мкМ) с 5'-[³²P]-меченными пРНК_{6S-1} (2 мкМ) длиной 20, 14, 13 и 12 н.о. (p20_{6S-1}, p14_{6S-1}, p13_{6S-1} и p12_{6S-1}). Дорожка 5 – 5'-[³²P]-меченная 6S-1 РНК. 6S-1 РНК* – неспецифический продукт ренатурации 6S-1 РНК (выделен серым шрифтом). (Б) Дорожки 1-6 – образование комплексов 6S-2 РНК (1 мкМ) с 5'-[³²P]-меченными пРНК_{6S-2} (2 мкМ) длиной 20, 16, 15, 14, 13 и 12 н.о. (p20_{6S-2}, p16_{6S-2}, p15_{6S-2}, p14_{6S-2}, p13_{6S-2} и p12_{6S-2}). Дорожка 7 – 5'-[³²P]-меченная 6S-2 РНК. Радиоавтографы 15%-ных ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Отметим, что комплекс 6S-1 РНК с пРНК_{6S-1} длиной 20 н.о. отличался более низкой подвижностью в геле по сравнению с комплексами, которые образуют 12-14-звенные пРНК_{6S-1} (рис. П.24А, дорожка 1). Вероятно, помимо большей молекулярной массы такой комплекс характеризуется чрезвычайно высокой стабильностью и способствует образовыванию альтернативной конформации 6S-1 РНК, принципиально отличающейся от конформаций молекулы в комплексе с 14-, 13- и 12-звенными пРНК. Поскольку синтез 20-звенных пРНК_{6S-1} при транскрипции с 6S-1 РНК не был зафиксирован, свойства пРНК_{6S-1} длиной 20 н.о. рассматриваются только для характеристики эффективности формирования комплексов 6S-1 РНК с олигорибонуклеотидами различной длины. Полученные в этом случае результаты не могут быть экстраполированы на ситуацию *in vivo*.

На следующем этапе исследования было проверена возможность взаимодействия предварительно сформированных дуплексов 6S РНК:пРНК с РНКП. В первую очередь были протестированы дуплексы 5'-[³²P]-меченной 6S-1 РНК с синтетическими 12-, 13-, 14- и 20-звенными пРНК_{6S-1} (рис. П.25). Было показано, что образование дуплекса 6S-1 РНК:p14_{6S-1} практически полностью предотвращает связывание РНКП с 6S-1 РНК (рис. П.25, дорожка 3). 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 препятствовать образованию комплекса 6S-1 РНК:РНКП с той же эффективностью (рис. П.25, дорожки 4-5). Однако 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 (рис. П.25, дорожки 9-10). По-видимому, в данном случае при добавлении РНКП фермент связывал свободную 6S-1 РНК.

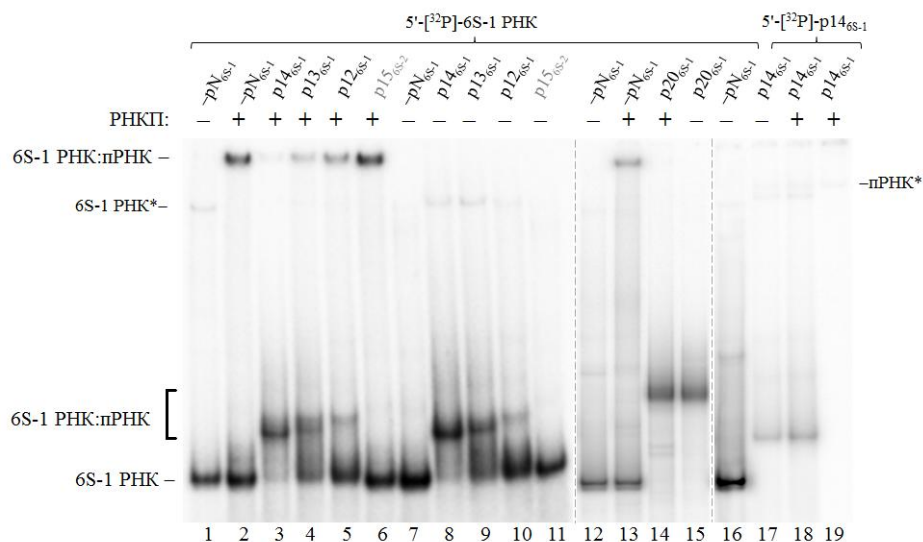


Рис. П.25. Анализ взаимодействия РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 6S-1 РНК и синтетическими пРНК длиной 12, 13, 14 и 20 н.о. (p12_{6S-1}, p13_{6S-1}, p14_{6S-1} и p20_{6S-1}, соответственно). Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 10 мкМ синтетической пРНК; 100 нг/мкл гепарина. Некомплементарный для 6S-1 РНК олигорибонуклеотид (p15_{6S-2}) выделен серым цветом. Дорожки 1, 7, 12 и 16 – исходная 5'-[³²P]-меченная 6S-1 РНК. Дорожки 2 и 13 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной 6S РНК в отсутствие пРНК (–pN_{6S-1}). Дорожки 3-6 и 14 – комплексообразование РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 5'-[³²P]-меченной 6S-1 РНК и синтетическими пРНК длиной 14, 13, 12, 15 и 20 н.о., соответственно. Дорожки 8-11 и 15 – формирование дуплексов между 5'-[³²P]-меченной 6S-1 РНК и синтетическими пРНК длиной 14, 13, 12, 15 н.о. и 20 н.о., соответственно. Дорожка 17 – дуплекс 6S-1 РНК с 5'-[³²P]-меченной p14_{6S-1}. Дорожка 18 – комплексообразование РНКП с предварительно сформированным дуплексом между 6S-1 РНК и 5'-[³²P]-меченной p14_{6S-1}. Дорожка 19 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной p14_{6S-1} (отрицательный контроль). 6S-1 РНК* – неспецифические продукты ренатурации 6S-1 РНК (альтернативные конформации). пРНК* – неспецифические сигналы 5'-[³²P]-меченной синтетической пРНК p14_{6S-1}, вероятно, являющиеся продуктами агрегации олигорибонуклеотида в растворе. Радиоавтограф 7,5%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Интересно, что с увеличением длины пРНК на каждый 1 н.о. (от 12 до 14 н.о.) скорость миграции дуплекса 6S-1 РНК:пРНК возрастала (рис. П.25, дорожки 3-5 и 8-10). Это, вероятно, свидетельствует о ступенчатом изменении конформации 6S-1 РНК при добавлении РНК-полимеразой каждого нового нуклеотида к синтезирующейся пРНК. В контрольном эксперименте было продемонстрировано, что некомплементарная 6S-1 РНК 15-звенная пРНК_{6S-2} не только не способна образовывать дуплекс с 6S-1 РНК, но и препятствовать формированию комплекса 6S-1 РНК:РНКП (рис. П.25, дорожки 6, 11). Добавим, что 20-звенная пРНК_{6S-1}, как и пРНК_{6S-1} длиной 14 н.о., образует стабильный

комплекс с 6S-1 РНК, который полностью теряет сродство к РНКП (рис. 10, дорожки 14-15). Таким образом, было установлено, что только пРНК_{6S-1} длиной не менее 14 н.о., образуя комплекс с 6S-1 РНК, полностью предотвращают его связывание с РНКП. Для подтверждения полученного результата, идентичные эксперименты были проведены с синтетической 14-звенной пРНК_{6S-1}, содержащей радиоактивную ³²P-метку (рис. П.25, дорожки 17-19). При автордиографии детектировался только комплекс 6S-1 РНК:пРНК, тогда как никаких комплексов с РНКП зафиксировано не было.

Аналогичные эксперименты были проведены и для 6S-2 РНК. Несмотря на практически 100%-ную эффективность связывания 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК с 15-звенной пРНК_{6S-2} (p15_{6S-2}) РНКП способна образовывать комплекс с 6S-2 РНК с эффективностью до ~30% (рис. П.26А, дорожка 3).

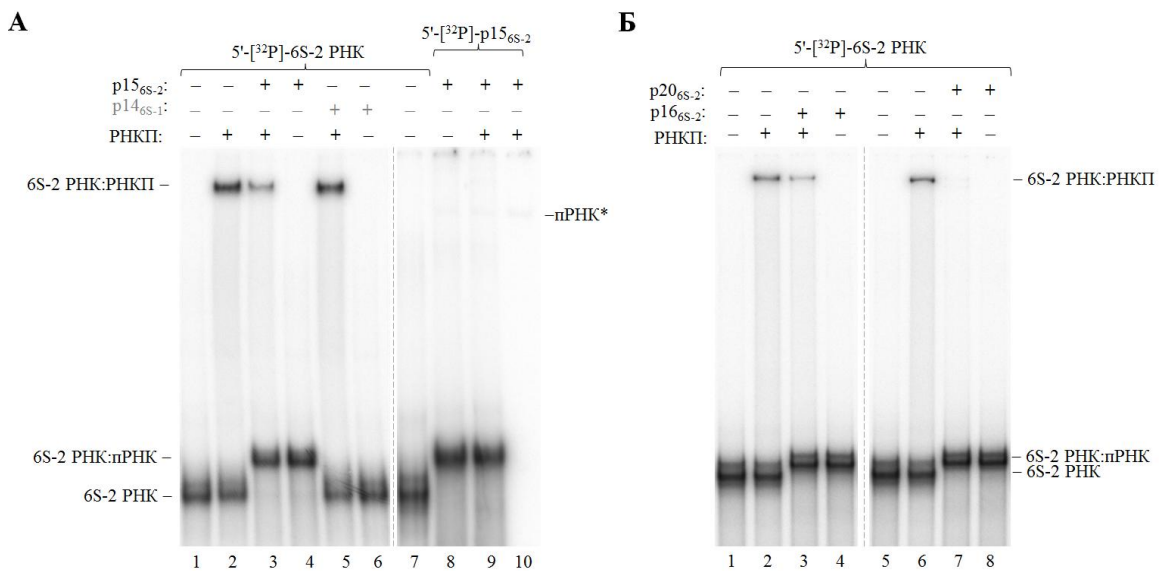


Рис. П.26. Анализ взаимодействия РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 6S-2 РНК и синтетическими пРНК различной длины. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 10 мкМ синтетической пРНК; 100 нг/мкл гепарина. (А) Комплексообразование РНКП с предварительно сформированным дуплексом между 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК и 15-звенной пРНК_{6S-2} (p15_{6S-2}, дорожка 3). Дорожки 1 и 7 – исходная 5'-[³²P]-меченная 6S-2 РНК. Дорожка 2 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК в отсутствие пРНК. Дорожки 4 и 6 – формирование дуплексов между 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК и, соответственно, p15_{6S-2} или p14_{6S-1} (некомплементарный для 6S-2РНК олигорибонуклеотид, выделен серым цветом). Дорожка 5 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК в присутствии p14_{6S-1}. Дорожка 8 – формирование дуплекса между 6S-2 РНК и 5'-[³²P]-меченной 15-звенной пРНК_{6S-2}. Дорожка 9 – комплексообразование РНКП с предварительно сформированным дуплексом между 6S-2 РНК и 5'-[³²P]-меченной 15-звенной пРНК_{6S-2}. Дорожка 10 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной 15-звенной пРНК_{6S-2} (отрицательный контроль). пРНК* – неспецифические сигналы 5'-[³²P]-меченных синтетических пРНК, вероятно, являющиеся продуктами агрегации олигорибонуклеотида в растворе. (Б) Комплексообразование РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК и 16-звенной пРНК_{6S-2} (p16_{6S-2}, дорожка 3) или 20-звенной пРНК_{6S-2} (p20_{6S-2}, дорожка 7). Дорожки 1 и 5 – 5'-[³²P]-меченная 6S-2 РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2 и 6 – комплексообразование РНКП с 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК в отсутствие пРНК. Дорожки 4 и 8 – формирование дуплексов между 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК и, соответственно, p16_{6S-2} или p20_{6S-1}. Радиоавтографы 7%-ных ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях.

Такой результат можно было бы объяснить способностью РНКП связывать дуплекс 6S-2 РНК:p15_{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 (рис. П.26А, дорожка 9). Альтернативным объяснением может быть нестабильность дуплекса 6S-2 РНК:p15_{6S-2} и его частичная диссоциация в присутствии РНКП. «Высвободившаяся» 6S-2 РНК при этом беспрепятственно взаимодействует с РНКП. Можно предположить, что связывание с 15-звенной пРНК_{6S-2} не изменяет должным образом конформацию 6S-2 РНК, и фермент по-прежнему способен узнавать такой субстрат. Вероятно, взаимодействие РНКП с дуплексом 6S-2 РНК:p15_{6S-2} приводит к немедленной диссоциации пРНК, поэтому «тройной» комплекс РНКП:6S-2 РНК:p15_{6S-2} в условиях эксперимента не детектируется. Увеличение длины пРНК_{6S-2} до 16 н.о. также не привело к существенному изменению её свойств (рис. П.26Б, дорожка 3). Несмотря на отсутствие свободной 5'-[³²P]-меченной 6S-2 РНК вследствие её 100%-ного связывания с 16-звенной пРНК_{6S-2}, комплекс 6S-2 РНК:РНКП по-прежнему детектировался при автордиографии. То есть фермент «конкурентно» вытеснял пРНК. Предотвратить этот процесс удалось только при использовании 20-звенного олигорибонуклеотида – аналога пРНК_{6S-2}. Несмотря на идентичную скорость миграции дуплекса 6S-2 РНК:p20_{6S-2} по сравнению с дуплексами, образованными более короткими олигорибонуклеотидами, он не подвергался диссоциации в присутствии РНКП и практически полностью предотвращал взаимодействие фермента с 6S-2 РНК (рис. П.26Б, дорожка 7).

Таким образом, теоретические данные о близких значениях ΔG° образования дуплексов между 14-звенной пРНК_{6S-1} и 6S-1 РНК и между 20-звенной пРНК_{6S-2} и 6S-2 РНК (рис. П.23) были подтверждены экспериментально. Однако, исходя только из экспериментов по комплексообразованию, нельзя однозначно утверждать, что данные дуплексы стабильны при добавлении РНКП и не диссоциируют, высвобождая 6S РНК. Кроме того, было необходимо проверить функциональность комплексов «высвободившейся» 6S РНК с ферментом при использовании более коротких олигорибонуклеотидов. Основным критерием функциональности комплекса 6S РНК:РНКП является синтез пРНК *de novo*. Схема предложенного нами эксперимента представлена на рис П.27А. Предварительно сформированные дуплексы 6S РНК с синтетическими пРНК разной длины инкубировали с РНКП, а затем добавляли смесь нуклеозидтрифосфатов, содержащую [α -³²P]UTP (в случае 6S-1 РНК) или [α -³²P]АТР (в случае 6S-2 РНК).

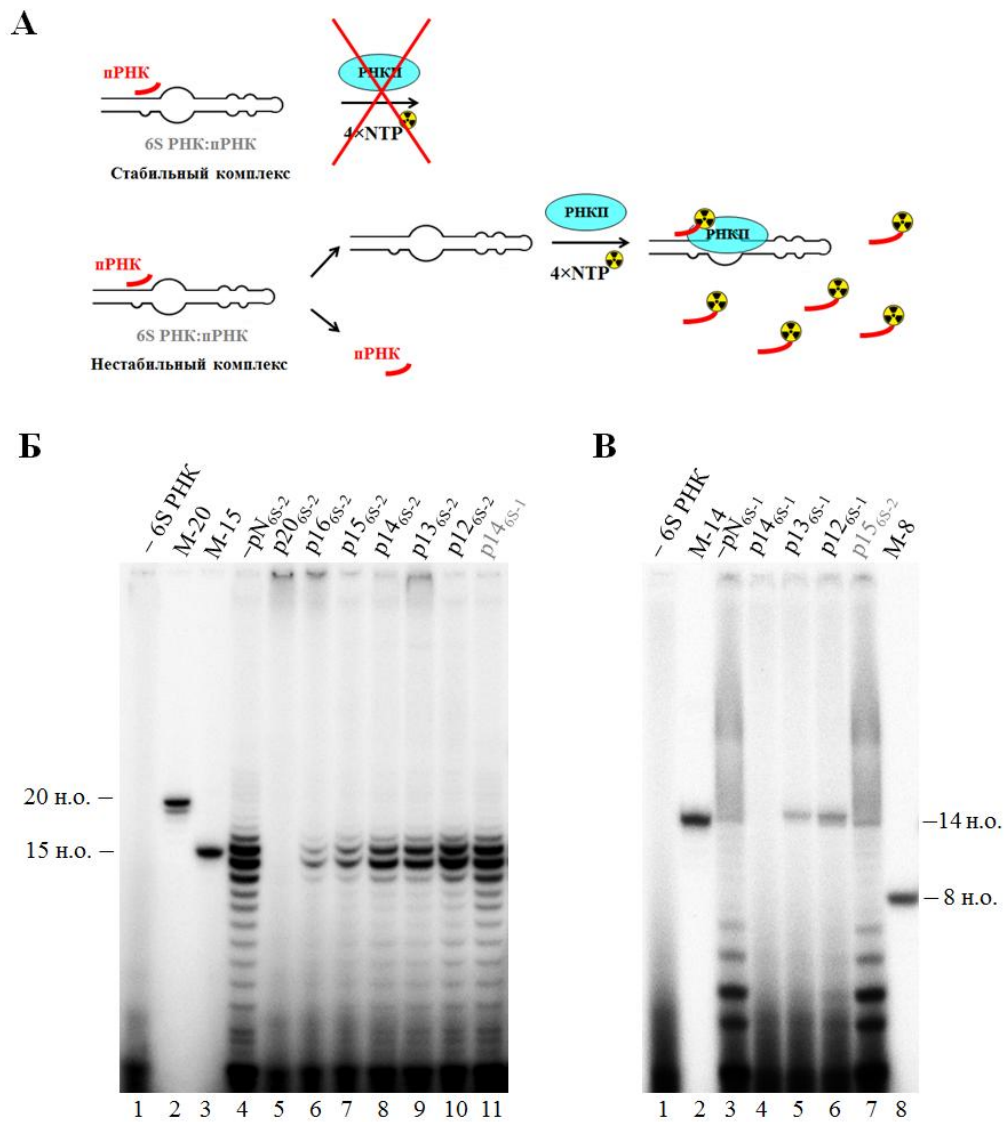


Рис. П.27. Транскрипция *de novo* пРНК в присутствии предварительно сформированных комплексов 6S-1 и 6S-2 РНК с синтетическими пРНК разной длины. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 10 мкМ синтетическая пРНК; 100 нг/мкл гепарина; 200 мкМ 4×NTP, 0,5 мКи [α - 32 P]UTP (в случае 6S-1 РНК) или [α - 32 P]-АТФ (в случае 6S-2 РНК). (А) Схема эксперимента. (Б) Транскрипция *de novo* пРНК в присутствии комплексов 6S-2 РНК с синтетическими пРНК различной длины. Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2 и 3 – маркеры длины РНК (М-20 и М-15), 5'-[32 P]-меченные олигорибонуклеотиды р20_{6S-2} и р15_{6S-2}, соответственно. Дорожка 4 – транскрипция *de novo* пРНК с матрицы 6S-2 РНК в отсутствие синтетических пРНК (–рN_{6S-2}). Дорожки 5-10 – транскрипция *de novo* пРНК в присутствии предварительно сформированных комплексов 6S-2 РНК с синтетическими пРНК_{6S-2} длиной 20, 16, 15, 14, 13 и 12 н.о., соответственно. Дорожка 11 – транскрипция *de novo* пРНК с матрицы 6S-2 РНК в присутствии некомплементарной пРНК_{6S-1} длиной 14 н.о. (р14_{6S-1}). (В) Транскрипция *de novo* пРНК в присутствии комплексов 6S-1 РНК с синтетическими пРНК различной длины. Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2 и 8 – маркеры длины РНК (М-14 и М-8), 5'-[32 P]-меченные олигорибонуклеотиды р14_{6S-1} и р8_{6S-1}, соответственно. Дорожка 3 – транскрипция *de novo* пРНК с матрицы 6S-1 РНК в отсутствие синтетических пРНК (–рN_{6S-1}). Дорожки 4-6 – транскрипция *de novo* пРНК в присутствии предварительно сформированных дуплексов между 6S-1 РНК и синтетическими пРНК_{6S-1} длиной 14, 13 и 12 н.о., соответственно. Дорожка 7 – транскрипция *de novo* пРНК с матрицы 6S-1 РНК в присутствии некомплементарной пРНК_{6S-2} длиной 15 н.о. (р15_{6S-2}). Появление «шлейфов» в дорожках 3 и 7 связано с неполной денатурацией реакционной смеси перед нанесением в гель. Радиоавтографы 25%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

Если комплекс 6S РНК:пРНК был достаточно стабилен и не диссоциировал, высвобождая 6S РНК, то даже в случае слабого неспецифического взаимодействия РНКП с таким комплексом фермент не мог вести транскрипцию. Наоборот, в случае даже незначительной диссоциации РНКП могла использовать высвободившуюся 6S РНК как матрицу для транскрипции пРНК *de novo*. Кроме того, такой эксперимент мог исключить или подтвердить возможность специфического взаимодействия комплексов 6S РНК:пРНК с РНКП, поскольку в таком случае фермент мог либо достраивать синтетические олигорибонуклеотиды до определенной длины, либо синтезировать пРНК, начиная с альтернативной стартовой точки транскрипции. Оба процесса существенно бы повлияли на набор продуктов транскрипции и их отличие от «стандартного» синтеза пРНК на матрице 6S РНК. Результаты экспериментов приведены на рис. П.27Б, В.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что взаимодействие 20-звенной пРНК_{6S-2} с 6S-2 РНК исключает возможность синтеза пРНК *de novo* (рис. П.27Б, дорожка 5). Это еще раз доказывает стабильность комплекса 6S-2 РНК:p20_{6S-2}, а также невозможность его взаимодействия с РНКП. В случае более коротких пРНК с уменьшением их длины повышается вероятность диссоциации комплекса 6S-2 РНК:пРНК_{6S-2}, высвобождения 6S-2 РНК и использование её РНК-полимеразой в качестве матрицы для транскрипции пРНК *de novo* (рис. П.27Б, дорожки 6-10). Следует подчеркнуть, что в этих случаях происходит транскрипция именно полноразмерных пРНК, а не удлинение синтетических олигорибонуклеотидов, так как при автордиографии в дорожках 6-7 (рис. П.27Б) уже детектируются транскрипты длиной 13-14 н.о. – более короткие, чем используемые синтетические пРНК (15-16 н.о.).

Результаты аналогичных экспериментов с 6S-1 РНК приведены на рис. П.27В. Образование комплекса 14-звенной пРНК_{6S-1} с 6S-1 РНК исключает возможность синтеза пРНК *de novo* (рис. П.27В, дорожка 4), тогда как в случае пРНК_{6S-1} длиной 13 и 12 н.о. транскрипция возможна. При автордиографии в дорожках 5-6 (рис. П.27В) детектируются только 14-звенные продукты транскрипции с матрицы 6S-1 РНК, поскольку их выход максимален.

Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что основные продукты транскрипции *in vitro* с матрицы 6S-2 РНК (13-16 н.о.) являются нефункциональными, так как 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 условиях *in vitro* выход пРНК_{6S-2}

длиной больше 17 н.о. составляет меньше ~ 3% от общего количества пРНК_{6S-2} разной длины (см. рис. II.21). Низкая эффективность синтеза длинных пРНК_{6S-2} с точки зрения глобального механизма взаимодействия 6S-2 РНК с РНКП означает, что лишь малый процент фермента, заблокированного в комплексе с 6S-2 РНК, имеет шанс «высвободиться» при синтезе пРНК. То есть снятия эффекта ингибирования транскрипции при синтезе пРНК_{6S-2} практически не происходит. Однако максимальный уровень экспрессии 6S-2 РНК наблюдается в экспоненциальной фазе роста клеток (см. раздел I.2.3.2 в главе «Обзор литературы»), то есть фазе активной транскрипции множества генов «домашнего хозяйства». Возможно, снятие 6S-2 РНК-зависимого ингибирования транскрипции обусловлено специфическими механизмами, неизвестными на настоящий момент и отличающимися от процессов, имеющих место в случае 6S-1 РНК *B. subtilis* и 6S РНК *E. coli*. Также не исключено, что тот малый процент функциональных пРНК_{6S-2} длиной 20-24 н.о. *in vivo* является достаточным для поддержания необходимого баланса между свободной РНКП и комплексом 6S-2 РНК:РНКП. Однако более вероятным объяснением является тот факт, 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 АТФ и ГТФ. Известно, что изменение их концентраций при переходе клеток *B. subtilis* из экспоненциальной в стационарную фазу роста (понижение уровня ГТФ и возрастание АТФ) вызывает существенные изменения в транскриптом за счет активации транскрипции с альтернативных промоторов [140]. К сожалению, на сегодняшний день не существует точных данных о физиологических концентрациях АТФ и ГТФ в клетках *B. subtilis*. В работе [149] концентрация АТФ в экспоненциальной фазе роста *B. subtilis* оценена как ~ 60 мкМ, тогда как внутриклеточный уровень ГТФ по данным [150] достигает ~ 1-3 мМ. В более ранней работе уровень АТФ в клетке оценен как в 3-4 раза превышающий концентрации остальных трех нуклеозидтрифосфатов [151].

Для изучения зависимости выхода пРНК от концентрации АТФ или ГТФ 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 каждого из остальных трех NTP в 200 мкМ концентрации (рис. II.28 и II.29). Продемонстрировано, что синтез пРНК_{6S-1} малоэффективен в присутствии 10-20 мкМ ГТФ, поскольку остаток G является первым нуклеотидом при транскрипции с матрицы 6S-1 РНК, а дальнейшее повышение концентрации ГТФ от 50 мкМ до 2 мМ практически не влияет ни на эффективность, ни на соотношение длин продуктов транскрипции

(рис. П.28А). Изменение концентрации АТР не влияет на выход транскрипции *in vitro*, однако с увеличением количества АТР в реакционной смеси РНКП более эффективно синтезирует 15- и 16-звенные пРНК_{6S-1} (рис. П.28Б).

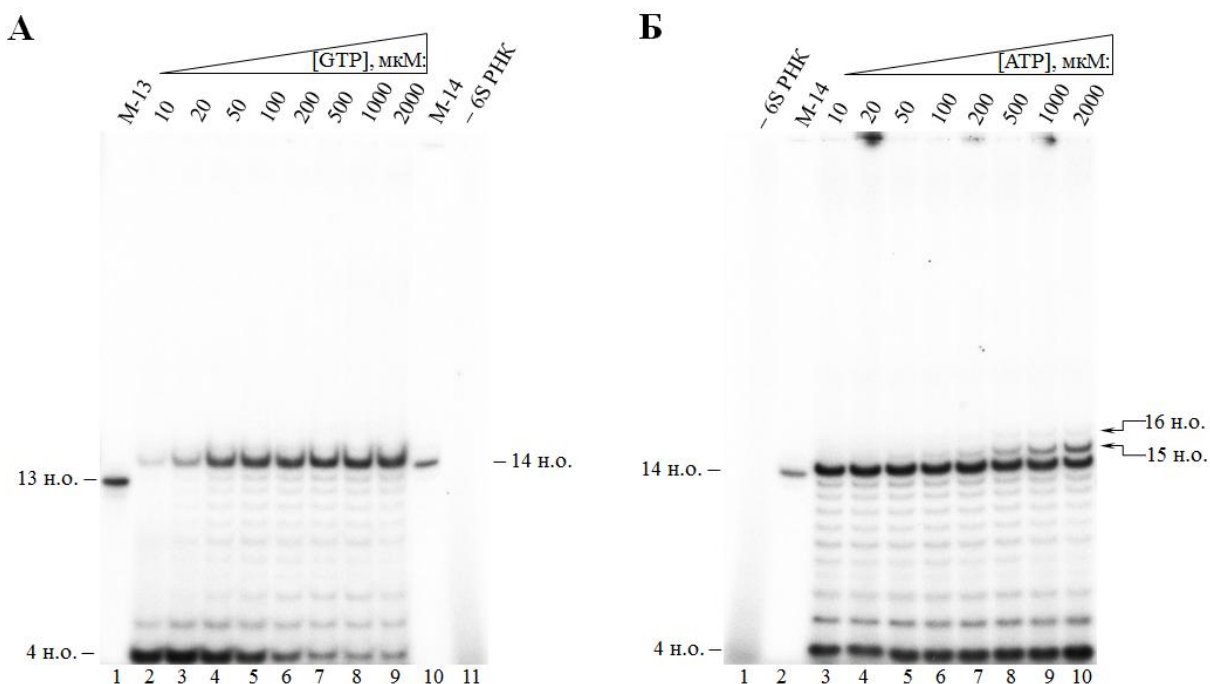


Рис. П.28. Влияние изменения концентрации ГТР (А) и АТР (Б) на синтез пРНК на матрице 6S-1 РНК. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S-1 РНК; 100 нг/мкл гепарина; 200мкМ каждого из трех NTP, 0,5 мкКи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$. (А) Дорожки 1 и 10 – маркеры длины РНК (М-13 и М-14), 5'- ^{32}P -меченные олигорибонуклеотиды р13_{6S-1} и р14_{6S-1}, соответственно. Дорожки 2-9 – синтез пРНК_{6S-1} в зависимости от концентрации ГТР (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 мкМ, соответственно). Дорожка 11 – реакционная смесь в отсутствие 6S-1 РНК (отрицательный контроль). (Б) Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S-1 РНК (отрицательный контроль). Дорожка 2 – маркер длины РНК (М-14), 5'- ^{32}P -меченный олигорибонуклеотид р14_{6S-1}. Дорожки 3-10 – синтез пРНК_{6S-1} в зависимости от концентрации АТР (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 мкМ, соответственно). Радиоавтографы 25%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

Несмотря на то, что пРНК_{6S-2} содержит только два остатка G (в положениях 4 и 5), эффективность её синтеза меняется при изменении концентрации ГТР (рис. П.29А) и достигает максимума при 500 мкМ, при этом соотношение длин продуктов реакции не изменяется. Наиболее значимым результатом является обнаружение высокой чувствительности эффективности синтеза пРНК_{6S-2} к концентрации АТР: при её низких значениях (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. Более того, дальнейшее увеличение концентрации АТР (1-2 мМ) приводит к заметному увеличению эффективности синтеза протяженных транскриптов длиной 23-26 н.о. (рис. П.29Б). При этом длина преобладающих продуктов транскрипции «смещается» в сторону 15-18 н.о. (по сравнению с 13-16 н.о. при 200 мкМ АТР). Напомним, 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.

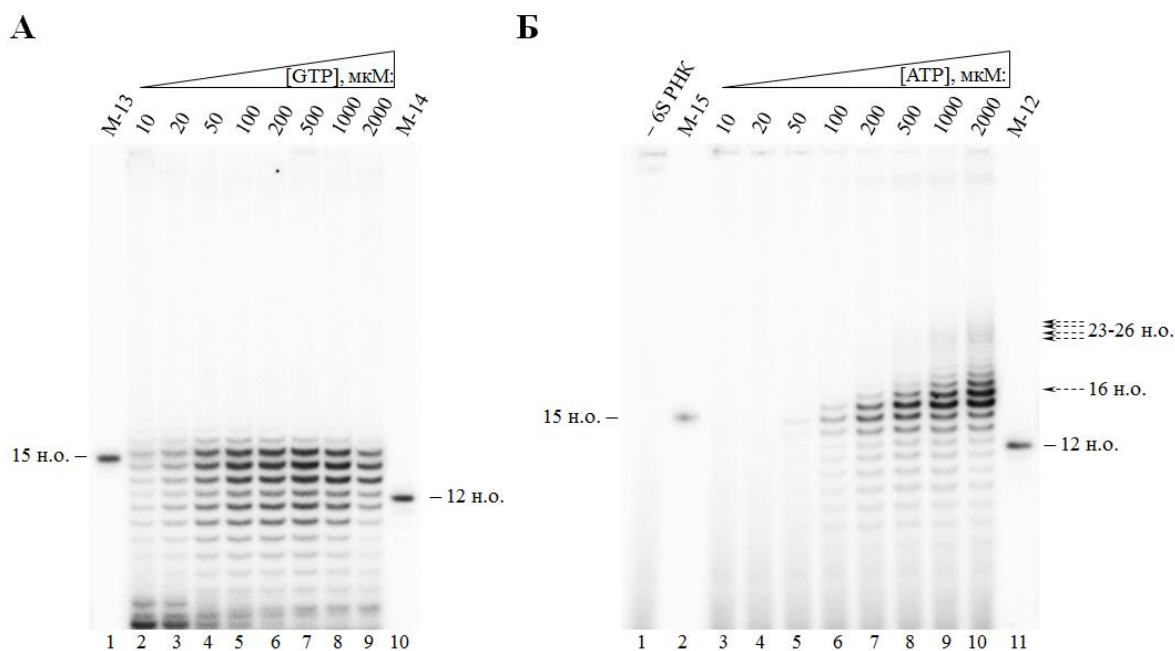


Рис. П.29. Влияние изменения концентрации GTP (А) и АТР (Б) на синтез пРНК на матрице 6S-2 РНК. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S-2 РНК; 100 нг/мкл гепарина; 200мкМ каждого из трех NTP, 0,5 мкКи [α - 32 P]АТР (при варьировании концентрации GTP) или [α - 32 P]УТР (при варьировании концентрации АТР). (А) Дорожки 1 и 10 – маркеры длины РНК (М-15 и М-12), 5'-[32 P]-меченные олигорибонуклеотиды p15_{6S-2} и p12_{6S-2}. Дорожки 2-9 – синтез пРНК_{6S-2} в зависимости от концентрации GTP (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 мкМ, соответственно). (Б) Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S-2 РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2 и 11 – маркеры длины РНК (М-15 и М-12), 5'-[32 P]-меченные олигорибонуклеотиды p15_{6S-2} и p12_{6S-2}. Дорожки 3-10 – синтез пРНК_{6S-2} в зависимости от концентрации АТР (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 мкМ, соответственно). Радиоавтографы 25%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что транскрипция пРНК с матрицы 6S-1 РНК может осуществляться в широком диапазоне концентраций GTP и АТР с высокой эффективностью. Эффективный синтез пРНК с матрицы 6S-2 РНК возможен только в присутствии сравнительного большего количества АТР (0,2–2 мМ). Более того, образование длинных пРНК_{6S-2}, формирующих стабильный комплекс с 6S-2 РНК и тем самым инициирующих высвобождение РНКП из её комплекса с 6S-2 РНК действительно происходит при высокой концентрации АТР (> 1 мМ). Однако вопрос, какие условия *in vivo* соответствуют необходимому для синтеза функциональных пРНК_{6S-2} внутриклеточному уровню АТР, остается открытым.

Еще одним возможным фактором, сдвигающим синтез пРНК в сторону более длинных или коротких транскриптов, может являться температура, поскольку стабильность дуплексов 6S РНК:пРНК должна прямо пропорционально зависеть от температурных условий, в которых находится клетка. Результаты транскрипции с

матрицы 6S-1 или 6S-2 РНК при различных температурах в диапазоне 4-50°C приведены на рис. П.30. В обоих случаях максимальная активность РНКП наблюдалась при 37°C, а при 50°C происходила инактивация фермента. При пониженных температурах (4-15°C) наблюдали увеличение интенсивности сигналов, соответствующих 13-звенной пРНК_{6S-1}, тогда как при 25°C эффективность её синтеза резко уменьшалась. Этот факт свидетельствует о «преждевременной» терминации транскрипции из-за более стабильного комплексообразования коротких пРНК_{6S-1} с 6S-1 РНК и потере сродства таких комплексов к РНКП при пониженной температуре. При 37-42°C, наоборот, увеличивался выход 15- и 16-звенных транскриптов, синтезирующихся на матрице 6S-1 РНК (рис. П.30А). В случае 6S-2 РНК не удалось четко проследить аналогичную тенденцию, хотя при температуре 4-15°C относительное количество синтезирующихся 12-15-звенных пРНК_{6S-2} по сравнению с транскриптами другой длины было больше чем при более высоких температурах. Возможно, в условиях холодового шока 15- и 16-звенные пРНК_{6S-2} медленнее диссоциируют из комплекса с 6S-2 РНК и могут выполнять свою функцию, вызывая высвобождение РНКП из её комплекса с 6S-2 РНК. Кроме того, в таких условиях может изменяться и конформация самой 6S-2 РНК в комплексе с пРНК_{6S-2}.

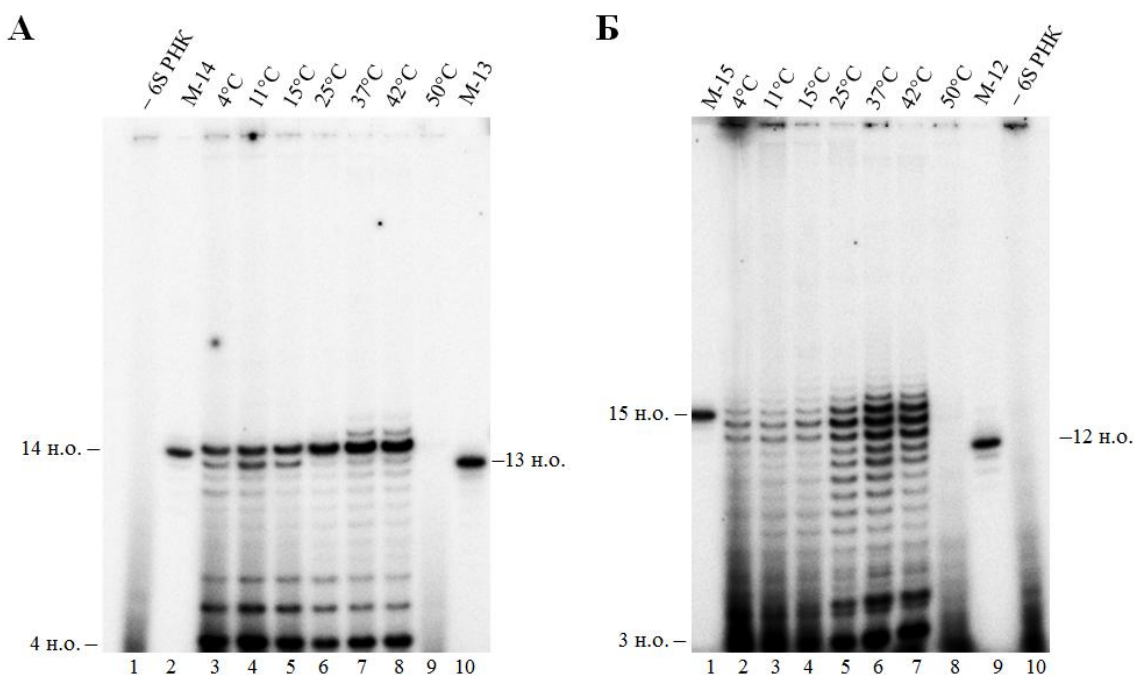


Рис. П.30. Зависимость длины преобладающих пРНК, синтезирующихся на матрице 6S-1 РНК (А) и 6S-2 РНК (Б) от температуры. Ф. к.: 1 мкМ РНКП; 1 мкМ 6S РНК; 100 нг/мкл гепарина; 200 мкМ 4×NTP, 0,5мкКи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (в случае 6S-1 РНК) или $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (в случае 6S-2 РНК). (А) Дорожка 1 – реакционная смесь в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2 и 10 – маркеры длины РНК (М-14 и М-13), 5'- ^{32}P -меченные олигорибонуклеотиды р14_{6S-1} и р13_{6S-1}. Дорожки 3-9 – синтез пРНК_{6S-1} при температуре 4, 11, 15, 25, 37, 42 и 50°C, соответственно. (Б) Дорожка 1 и 9 – маркеры длины РНК (М-15 и М-12), 5'- ^{32}P -меченные олигорибонуклеотиды р15_{6S-2} и р12_{6S-2}. Дорожка 10 – реакционная смесь в отсутствие 6S РНК (отрицательный контроль). Дорожки 2-8 – транскрипция пРНК_{6S-2} при температуре 4, 11, 15, 25, 37, 42 и 50°C, соответственно. Радиоавтографы 25%-ных ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

Таким образом, в ходе изучения особенностей взаимодействия РНКП с 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* удалось установить факт синтеза пРНК на обеих 6S РНК и определить нуклеотидные последовательности пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. Была продемонстрирована способность синтезированных пРНК образовывать дуплексы с соответствующей 6S РНК и приводить к высвобождению РНКП из её комплекса с 6S РНК. В ходе исследования было обнаружено важное отличие в функционировании 6S-1 и 6S-2 РНК. Длина преобладающих при транскрипции *in vitro* пРНК_{6S-2} (13-16 н.о.) является недостаточной для эффективного комплексообразования с 6S-2 РНК, а синтез более протяженных продуктов транскрипции, формирующих прочный дуплекс с 6S-2 РНК, незначителен и, по всей видимости, требует особых условий. Показано, что одним из таких условий может являться высокая концентрация АТФ, стимулирующая синтез пРНК_{6S-2} длиной 17-18 и 23-26 н.о.

II.6. Исследование роли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis in vivo*

На сегодняшний день существует мало данных о физиологической роли 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis in vivo*. В работе [52] было показано, что делеция гена *bsrA*, кодирующего 6S-1 РНК, незначительно замедляет рост клеток в экспоненциальной фазе роста. Позднее, было продемонстрировано, что этот эффект обусловлен присутствием 6S-2 РНК (*bsrB*) в отсутствие 6S-1 РНК и максимально проявляется при выходе клеток из стационарной фазы [64] (глава «Обзор литературы», раздел I.2.3.2). Однако никаких доказательств токсичности 6S-2 РНК для клетки в отсутствие 6S-1 РНК на сегодняшний день нет. Поскольку удаление 6S-1 и/или 6S-2 РНК оказывает лишь незначительное влияние на фенотип клеток *B. subtilis*, неизвестно, в каких масштабах при этом изменяется экспрессия клеточных белков. Напомним, что эффект ингибирования транскрипции в присутствии 6S-1 и 6S-2 РНК экспериментально был установлен только в нашей работе (в условиях *in vitro*). Поэтому актуальной задачей является изучение влияния делеций генов *bsrA* и *bsrB* на состав клеточных белков методом сравнительного протеомного анализа. Для его проведения необходимо было сконструировать клеточные линии *B. subtilis*, нокаутные по генам *bsrA* и/или *bsrB*, а также проверить их жизнеспособность. Косвенным доказательством функционирования 6S РНК *in vivo* также является синтез пРНК, однако детекция таких коротких РНК из-за их малой длины и быстрой деградации в клетках, как правило, затруднена. Поэтому в наших исследованиях использовалась оптимизированная методика блот-гибридизации в варианте Нозерн [145] с применением комплементарных к РНК-мишени зондов смешанной природы – олигодезоксирибонуклеотидов с включениями остатков ковалентно замкнутых нуклеозидов (см. раздел II.5).

II.6.1. Характеристика клеточных линий *B. subtilis*, используемых для выяснения роли 6S-1 и 6S-2 РНК *in vivo*

В лаборатории проф. Р. Хартманна (Институт фармацевтической химии, Марбургский Университет имени Филиппа, г. Марбург, Германия) на основе штамма *B. subtilis* PY79 были получены клеточные линии с делециями генов *bsrA* и/или *bsrB* (табл. III.1, глава «Экспериментальная часть»). Из клеток с двойным нокаутом ($\Delta bsrAB$) также были получены штаммы с измененной локализацией генов *bsrA* или *bsrB*: $\Delta bsrAB+A$ и $\Delta bsrA+B$. Инсерции соответствующих фрагментов ДНК проводили в локус *amyE*, кодирующий α -амилазу и не являющийся необходимым для жизнедеятельности *B. subtilis*. Таким образом, штаммы $\Delta bsrAB+A$ и $\Delta bsrA+B$ содержали «комплемент» гена *bsrA* или *bsrB*. Штамм *B. subtilis* PY79 является прототрофным производным²³ штамма *B. subtilis* 168 и в последнее время широко применяется в различных масштабных генетических исследованиях в системе *B. subtilis* [152]. Мы проверили экспрессию (или её отсутствие) 6S-1 и/или 6S-2 РНК в полученных мутантных штаммах (рис. II.31). Для этого использовали метод блот-гибридизации общей РНК, выделенной из стационарной (для 6S-1 РНК) и экспоненциальной (для 6S-2 РНК) фаз клеточного роста с комплементарными РНК-зондами, содержащими остатки DIG-меченного уридина (см. главу «Экспериментальная часть»).

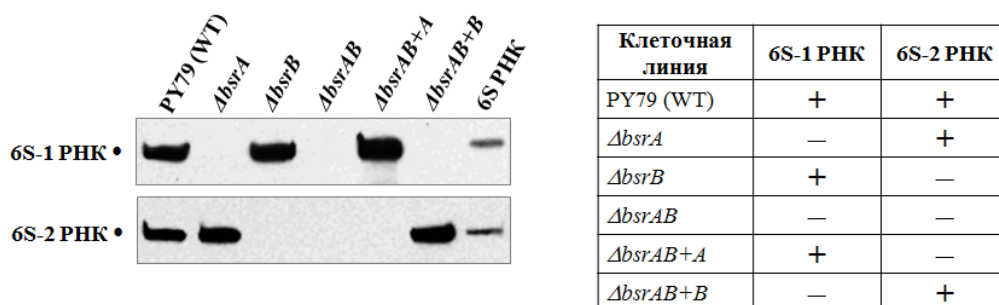


Рис. II.31. Сравнительный анализ экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК в различных клеточных линиях *B. subtilis*: PY79(WT) – дикий тип *B. subtilis* штамма PY79; $\Delta bsrA$ и $\Delta bsrB$ – *B. subtilis* PY79 с делециями генов *bsrA* или *bsrB*, соответственно; $\Delta bsrAB$ – *B. subtilis* PY79 с двойной делецией генов *bsrA* и *bsrB*; $\Delta bsrAB+A$ и $\Delta bsrAB+B$ – *B. subtilis* PY79 с «комплементом» генов *bsrA* или *bsrB*, соответственно. Нозерн-блоттинг общей РНК (3 мкг), выделенной из клеток в экспоненциальной (для 6S-2 РНК, $A_{600} \sim 1$ OE) или стационарной (для 6S-1 РНК, $A_{600} \sim 4$ OE) фазах роста. 6S РНК – контроли, 6S-1 или 6S-2 РНК (2 нг), соответственно.

Делеция генов *bsrA* и/или *bsrB* исключает синтез 6S-1 и/или 6S-2 РНК в клетках $\Delta bsrA$, $\Delta bsrB$ и $\Delta bsrAB$, а добавление «комплемента» того или другого гена ($\Delta bsrAB+A$ и

²³ Штамм *B. subtilis* PY79 впервые был получен в работе [153] путем удаления ауксотрофных маркеров штамма *B. subtilis* CU1769 (*metB5*, *glnA100*) в процессе двукратной трансдукции фагом PBS1 из лизатов *B. subtilis* 168. Родительским штаммом CU1769 является *B. subtilis* W168 – производное *B. subtilis* 168, полученное в результате трансформации клеток штамма 168 геномной ДНК прототрофного штамма *B. subtilis* W23 (подробнее см. [152]).

$\Delta bsrA+B$) является эффективным и приводит даже к некоторому повышению уровня экспрессии 6S РНК по сравнению с клетками дикого типа (рис. П.31).

Проведенные манипуляции с геномом *B. subtilis* практически не влияли на жизнеспособность и скорость роста клеток (рис. П.32). Различия значений оптической плотности клеточных культур после 24 ч выращивания являются сравнимыми в пределах погрешностей измерения, и только клетки с двойным нокаутом генов *bsrA* и *bsrB* замедляют скорость роста на стадии перехода из экспоненциальной в стационарную фазу.

Незначительное снижение максимальной наблюдаемой оптической плотности замечено для клеток $\Delta bsrB$ по сравнению с клетками дикого типа, однако такой эффект не обнаружен для клеточной линии $\Delta bsrAB+A$ с «комплементом» гена *bsrA*, и, вероятно, не связан с отсутствием 6S-2 РНК.

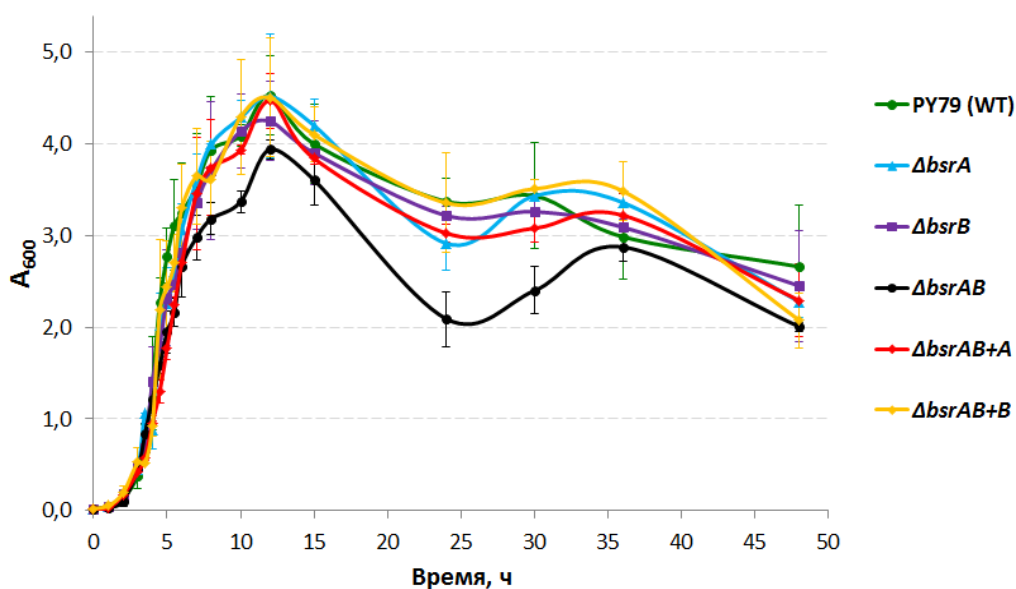


Рис. П.32. Кривые клеточного роста *B. subtilis* PY79 (WT, зеленая) и мутантных клеточных линий $\Delta bsrA$ (голубая), $\Delta bsrB$ (фиолетовая), $\Delta bsrAB$ (черная), $\Delta bsrAB+A$ (красная) и $\Delta bsrAB+B$ (желтая).

Отметим, что делеция гена *bsrA* не приводила к существенным изменениям в скорости роста клеток, описанным в работах [4, 64]. По всей видимости, как 6S-1, так и 6S-2 РНК *B. subtilis*, не являются критически необходимыми для жизни клеток при культивировании в богатых питательных средах, и поведение той или иной мутантной клеточной линии сильно зависит от конкретных условий проведения эксперимента. Нельзя исключить и существования различий в поведении при культивировании клеток штамма *B. subtilis* 168 (использовавшихся в работах [4, 64]) и *B. subtilis* PY79.

Исходя из полученных результатов для клеточной линии *B. subtilis* PY79 и её мутантных производных можно предположить, что 6S-1 и 6S-2 РНК являются взаимозаменяемыми и при отсутствии одной нкРНК, вторая нкРНК выполняет функцию

ингибитора транскрипции. Только в отсутствие обеих 6S РНК в условиях недостатка питательных веществ неконтролируемая транскрипция генов приводит к негативным последствиям для клетки. Однако с учетом различий, обнаруженных в процессе синтеза пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} (раздел II.5), эта гипотеза требует дополнительных подтверждений.

II.6.2. Синтезируются ли пРНК *in vivo*?

В ходе совместной работы с немецкими коллегами (лабораторией проф. Р. Хартманна) был проведен анализ общей РНК, выделенной из клеток *B. subtilis* штамма 168 на различных стадиях клеточного роста, и секвенированы фрагменты РНК длиной менее 50 н.о. Было обнаружено, что максимальное количество считываний области 6S-1 РНК, комплементарной пРНК_{6S-1}, происходит на стадии выхода клеток из стационарной фазы при разбавлении клеточной культуры свежей питательной средой. По сравнению со стационарной фазой эффективность транскрипции *in vivo* коротких пРНК_{6S-1} (длиной 8-13 н.о.) возрастает в ~ 10 раз, а длинных пРНК_{6S-1} (14 н.о.) – более чем в 50 раз [153]. Этот факт свидетельствует об активном функционировании 6S-1 РНК *in vivo* в соответствии с механизмами, наблюдаемыми в условиях *in vitro*. Статистически значимого количества считываний области 6S-2 РНК, комплементарной пРНК_{6S-2}, обнаружено не было. Возможными объяснениями этого факта могут служить быстрая деградация синтезирующихся *in vivo* пРНК_{6S-2} или низкая эффективность их синтеза в исследуемых условиях роста клеток. Кроме того, высокое содержание остатков А в природной пРНК_{6S-2} может привести к потере части сигналов, поскольку одной из стадий получения библиотек кДНК для последующего секвенирования является полиаденилирование общей РНК.

Альтернативным методом детекции пРНК *in vivo* является блот-гибридизация общей РНК, выделенной из клеток *B. subtilis* на различных стадиях клеточного роста, со специфичными зондами – комплементарными олигодезоксирибонуклеотидами, содержащими остатки ковалентно замкнутых нуклеозидов (см. раздел II.5). Продукты гибридизации можно детектировать методом автордиографии при использовании 5'-[³²P]-меченного зонда или с помощью иммуноферментного анализа при использовании зонда, содержащего остаток дигоксигенина (DIG). DIG-антитела ковалентно связаны с щелочной фосфатазой и в процессе детекции дефосфорилируют коммерческий реагент CDP-star, в результате чего происходит разгорание люминесценции ($\lambda = 465$ нм). Мы сравнили чувствительность двух методов детекции в контрольном эксперименте (рис. II.33). Для этого различные количества синтетических пРНК_{6S-2} длиной 15 и 20 н.о. иммобилизовали на нейлоновой мембране с помощью N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодимид гидрохлорида, и затем проводили

гибридизацию при 68°C с тем или другим зондом (см. главу «Экспериментальная часть»). Оба зонда содержали идентичную 12-звенную нуклеотидную последовательность с включениями 4 остатков ковалентно замкнутых нуклеозидов, но 5'-[³²P]-меченный зонд содержал еще 3 дополнительных н.о. на 5'-конце для более прочной гибридизации. На основании полученных результатов можно утверждать, что основанный на детекции хемилюминесценции метод является более чувствительным по сравнению с использованием радиоактивного зонда и позволяет обнаружить гораздо меньшие количества пРНК вплоть до 0,01 нг.

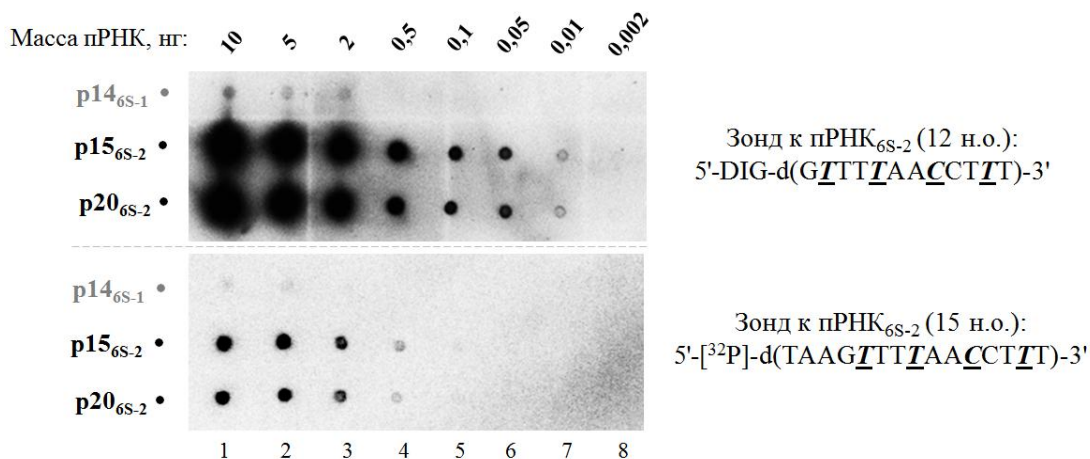
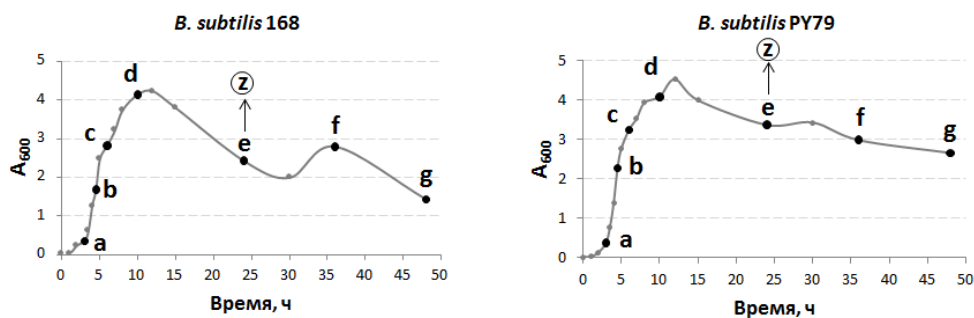


Рис. П.33. Анализ чувствительности метода блот-гибридизации синтетических олигорибонуклеотидов – аналогов пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} – с DIG-меченным (300 пмоль на мембрану) и [³²P]-меченным (10 мкКи на мембрану) зондами к пРНК_{6S-2}. Некомплементарный олигорибонуклеотид (p14_{6S-1}) выделен серым цветом. Последовательности зондов, используемых для гибридизации, указаны справа. Остатки ковалентно замкнутых нуклеозидов (LNA) выделены жирным курсивом и подчеркнуты. DIG – остаток дигоксигенина. Время экспозиции сигналов хемилюминесценции – 5 мин, радиоактивности – 6 ч.

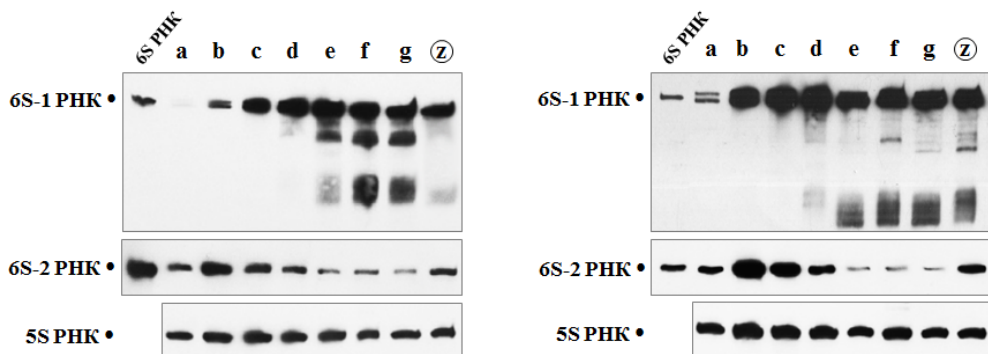
На следующем этапе были проанализированы общие РНК, выделенные из клеток *B. subtilis* PY79 на различных стадиях клеточного роста. Для этого клеточные линии культивировали в богатой питательной среде в течение 48 ч, отбирая аликвоты для выделения общей РНК через 3, 4,5, 6, 10, 24, 36 и 48 ч после инокуляции (рис. П.34А). Кроме того, для моделирования условий выхода из стационарной фазы 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 (рис. П.34А, точка z). Для сравнения также использовали общую РНК, выделенную из клеток *B. subtilis* 168.

В первую очередь проводили блот-гибридизацию выделенной общей РНК с зондами к 6S-1 и 6S-2 РНК для контроля их экспрессии (рис. П.34Б), а также с зондом к 5S РНК в качестве РНК сравнения. Профили экспрессии обеих 6S РНК в штаммах *B. subtilis* 168 и PY79 немного отличаются, но общая тенденция изменения концентраций этих нкРНК сохраняется.

А



Б



В

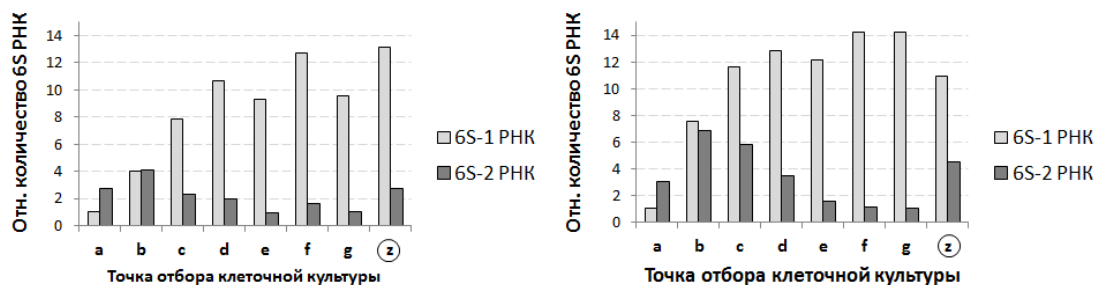


Рис. П.34. Анализ профилей экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК в клетках *B. subtilis* 168 и *B. Subtilis* PY79. (А) Кривые клеточного роста *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* PY79. Черными точками и буквами (a-g) отмечено время отбора аликвот клеточной культуры для выделения общей РНК: 3, 4, 5, 6, 10, 24, 36 и 48 ч, соответственно. Буквой z в круге отмечена аликвота клеточной культуры, использовавшаяся для моделирования стадии выхода из стационарной фазы роста клеток. (Б) Результаты блот-гибридизации общей РНК (3 мкг), выделенной на различных стадиях роста *B. subtilis* с зондами к 6S-1, 6S-2 и 5S РНК. Положительные контроли – 6S-1 РНК (2 нг) или 6S-2 РНК (10 нг в случае *B. subtilis* 168 и 2 нг в случае *B. subtilis* PY79). (В) Диаграммы изменения уровней экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК в клетках *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* PY79 (нормированные по концентрации 5S РНК) в промежутки времени, соответствующие точкам отбора клеточной культуры. 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 в обоих случаях аккумулируется в поздней экспоненциальной – ранней стационарной фазах роста клеток. После 24 ч культивации клеток зафиксирована сильная деградация 6S-1 РНК (до 50%), затрудняющая оценку суммарного количества этой РНК, однако уровень полноразмерной 6S-1 РНК в среднем остается постоянным или даже немного возрастает. Напомним, что в клетках *B. subtilis* экспрессируются два варианта 6S-1 РНК – зрелая 6S-1 РНК длиной 190 н.о. и её предшественник длиной 201 н.о. (см. раздел I.2.3.2 в главе «Обзор литературы»), поэтому при блот-гибридизации

детектируются две полосы. Максимальная концентрация 6S-2 РНК, наоборот, наблюдается в средней экспоненциальной фазе роста клеток, а затем снижается в ~4–7 раз при переходе в позднюю стационарную фазу (рис. П.34В). Как в случае *B. subtilis* 168, так и *B. subtilis* PY79 при увеличении содержания питательных веществ в культуральной среде и выходе клеток из стационарной фазы вновь наблюдается повышение уровня 6S-2 РНК (рис. П.34Б, В, точки **z**). Сигналов деградации 6S-2 РНК зафиксировано не было. Отметим, что представленные диаграммы (рис. П.34В) отражают только степень изменения отдельно рассматриваемых уровней экспрессии каждой из 6S РНК, и не применимы для количественной оценки содержания в клетке этих нкРНК относительно друг друга.

Те же образцы общей РНК, выделенной из клеток *B. subtilis* 168 и PY79, были проанализированы методом блот-гибридизации с зондами к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} (рис. П.35).

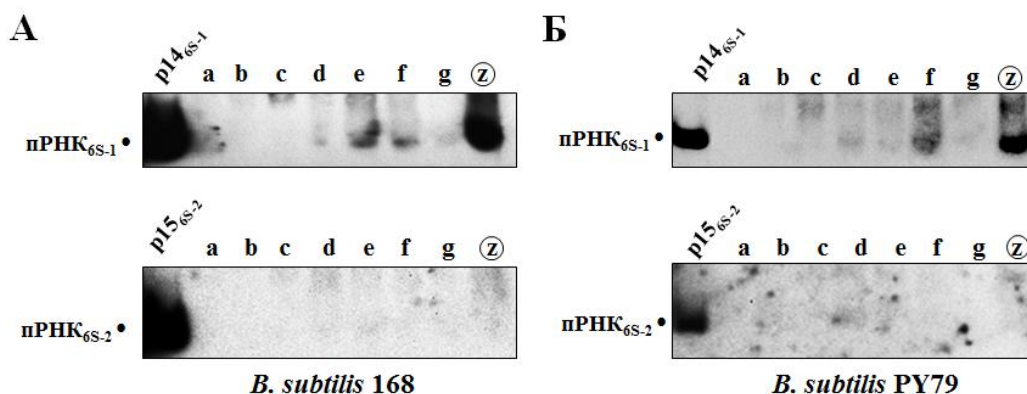


Рис. П.35. Результаты блот-гибридизации общей РНК (10 мкг), выделенной на различных стадиях роста клеток *B. subtilis* 168 (**А**) и *B. subtilis* PY79 (**Б**) с зондами к пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}. В качестве положительных контролей использовали синтетические пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2} длиной 14 и 15 н.о., соответственно (p14_{6S-1} и p15_{6S-2}, 0,5 нг). 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 клеток (см. рис. П.34).

В случае 6S-1 РНК удалось детектировать слабые сигналы пРНК на протяжении практически всей стационарной фазы роста клеток *B. subtilis* как штамма 168, так и штамма PY79, а максимальная концентрация пРНК_{6S-1} в обоих случаях была зафиксирована на стадии выхода из стационарной фазы (рис. П.35, дорожки **z**). Напомним, что синтез пРНК в стационарной фазе (точки **d–g**) ещё не означает снятие эффекта ингибирования РНКП (см. раздел П.5). Согласно данным секвенирования (см. выше), в этой фазе происходит транскрипция, главным образом, олигорибонуклеотидов длиной 8-12 н.о. [152], которые неспособны оставаться прочно связанными с 6S-1 РНК и не приводят к диссоциации комплекса 6S-1 РНК:РНКП. Таким свойством обладают только 14-звенные пРНК-транскрипты, синтез которых аккумулируется на стадии выхода из

стационарной фазы. В случае 6S-2 РНК детектировать статистически значимые сигналы, соответствующие пРНК_{6S-2} не удалось. Мы предположили, что более эффективный синтез пРНК_{6S-2} может происходить в мутантных клеточных линиях *ΔbsrA* и *ΔbsrAB+B*, поскольку в отсутствие 6S-1 РНК концентрация 6S-2 РНК оставалась высокой на протяжении всего времени культивирования клеток (рис. II.36А, Б). Вероятно, в стационарной фазе 6S-1 РНК должна ингибировать помимо транскрипции различных генов и транскрипцию 6S-2 РНК, а в её отсутствие (в нокаутных клетках *ΔbsrA* и *ΔbsrAB+B*) этого не происходит.

Результаты блот-гибридизации общей РНК, выделенных из клеточных линий *ΔbsrA*, *ΔbsrAB+B* и *ΔbsrB* (отрицательный контроль), с зондом к пРНК_{6S-2} приведены на рис. II.36В. Для повышения чувствительности детекции гибридизацию проводили при температуре 25°C, что, однако, снижает специфичность детекции.

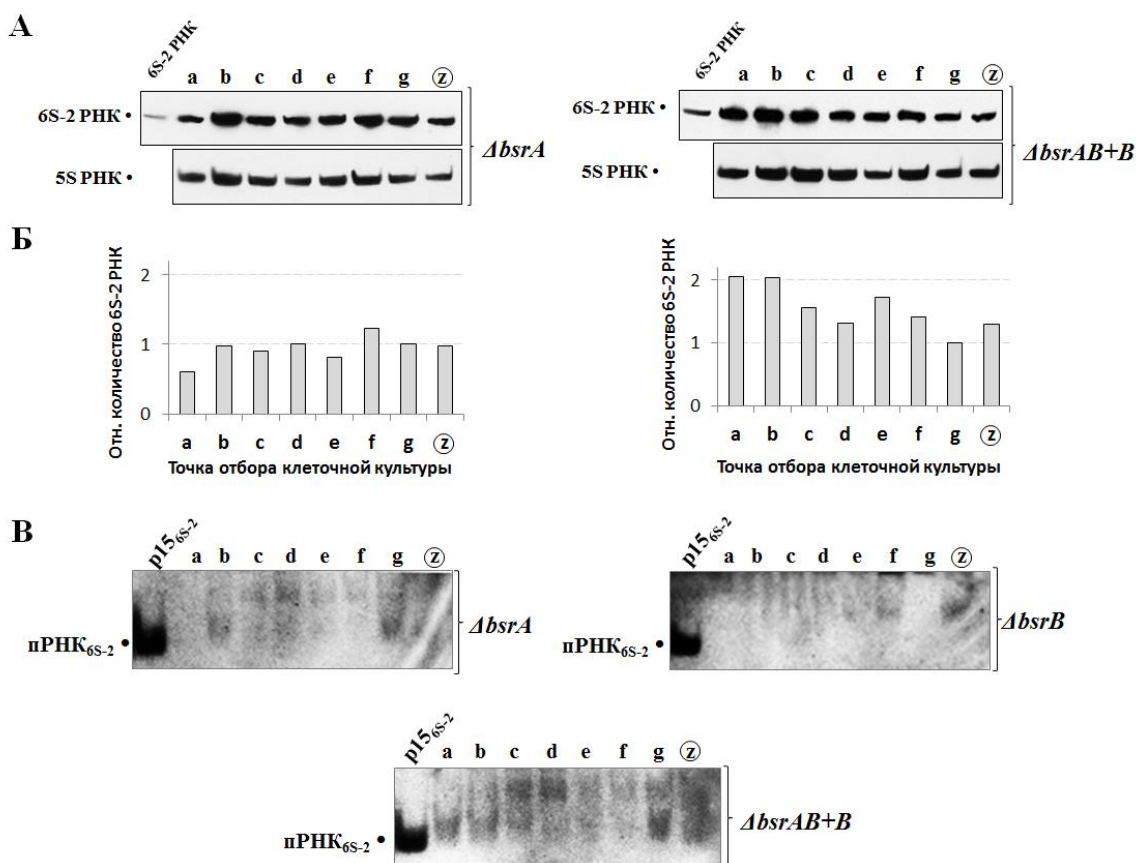


Рис. II.36. Анализ профилей экспрессии 6S-2 РНК в клетках *ΔbsrA* и *ΔbsrAB+B* (А, Б) и пРНК_{6S-2} в клетках *ΔbsrA*, *ΔbsrB* и *ΔbsrAB+B* (В). (А) Результаты блот-гибридизации общей РНК (3 мкг), выделенной на различных стадиях роста клеток *ΔbsrA* и *ΔbsrAB+B*, с зондами к 6S-2 и 5S РНК. (Б) Диаграммы уровней экспрессии 6S-2 РНК в клетках *ΔbsrA* и *ΔbsrAB+B* (нормированных по концентрации 5S РНК) в промежутки времени, соответствующие точкам отбора клеточной культуры. За единицу принимали минимальную концентрацию 6S-2 РНК (в точке g). (В) Результаты блот-гибридизации общей РНК (10 мкг), выделенной на различных стадиях роста клеток *ΔbsrA*, *ΔbsrAB+B* и *ΔbsrB* с зондом к пРНК_{6S-2}. 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 клеток (см. рис. II.34).

Максимальная интенсивность сигналов, вероятно, соответствующих пРНК_{6S-2}, наблюдалась для клеточной линии $\Delta bsrAB+B$ с комплементом гена *bsrB*, однако длина детектируемых РНК была несколько больше ожидаемой. Аналогичные сигналы в общей РНК, выделенной из клеток $\Delta bsrB$, отсутствовали, хотя в дорожках **f** и **z** детектировались сигналы, расположенные немного выше предполагаемых сигналов пРНК_{6S-2}. Именно в этих образцах (**f** и **z**), как правило, наблюдается максимальный синтез пРНК_{6S-1} (рис. П.35Б), которая может неспецифически гибридизоваться с зондом к пРНК_{6S-2}, хотя вероятность такого процесса крайне низка (см. рис. П.33). В клетках $\Delta bsrA$ и $\Delta bsrAB+B$ неспецифическая гибридизация с пРНК_{6S-1} исключена в связи с отсутствием 6S-1 РНК. Зонд к пРНК_{6S-2} также может гибридизоваться с продуктами деградации 6S-2 РНК, однако ни в одном из проанализированных образцов общей РНК не наблюдался заметный распад 6S-2 РНК.

Сигналы пРНК_{6S-2}, детектируемые в клеточной линии $\Delta bsrAB+B$, достаточно интенсивны, и могут рассматриваться как экспериментальное свидетельство транскрипции пРНК с матрицы 6S-2 РНК *in vivo*. Можно предположить, что они соответствуют протяженным пРНК_{6S-2} длиной 23-26 н.о., синтез которых *in vitro* был описан в разделе П.5. Однако в клетках дикого типа аналогичные сигналы не были обнаружены, поэтому вопрос об условиях, в которых синтез пРНК_{6S-2} происходит *in vivo* остается открытым.

II. 6. 3. Влияние делеций генов *bsrA* и *bsrB* на экспрессию белков *B. subtilis*

Являясь глобальным ингибитором транскрипции, 6S РНК существенно влияет на экспрессию большого числа белков. Как было описано в разделе I.2.2.1, транскрипционная активность более чем 500 генов *E. coli* изменяется (увеличивается или уменьшается) в отсутствие 6S РНК [35]. Однако данных о влиянии 6S-1 и 6S-2 РНК на экспрессию генов *B. subtilis* до настоящей работы в литературе представлено не было.

Поскольку максимальная концентрация 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* в клетке наблюдается в различных фазах клеточного роста (см. рис. П.34В), можно предположить, что эти нкРНК ингибируют транскрипцию с промоторов, активных в той или иной фазе. Соответственно, состав клеточных белков в присутствии и в отсутствие 6S-1 и/или 6S-2 РНК *B. subtilis* должен отличаться.

Чтобы проверить эту гипотезу, был проведен сравнительный анализ полных протеомов нокаутных клеточных линий *B. subtilis* и клеток дикого типа. Для этого все клеточные культуры выращивали в отсутствие антибиотиков для исключения их возможного влияния на экспрессию клеточных белков и корректного сравнения с

клетками «дикого» типа (не имеющими резистентности к антибиотикам). Отбор алиquot 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). Выбор времени отбора проб был продиктован характером изменения концентраций 6S-1 и 6S-2 РНК: при значении оптической плотности клеточной культуры $A_{600} \sim 1$ О.Е. 6S-2 РНК должна количественно преобладать над 6S-1 РНК, а в точке, соответствующей $A_{600} \sim 4$ О.Е., концентрация полноразмерной 6S-1 РНК уже достигает практически максимального значения, при этом деградация молекулы проявляется еще не столь значительно.

В белки из сравниваемых клеточных линий вводили разные лизин-специфичные флуоресцентные красители – гидроксисукцинимидные эфиры Су3 и Су5. Каждый из флуоресцентных красителей характеризуется собственными длинами волн поглощения и испускания (Су3: $\lambda_{\text{погл}} = 550$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 570$ нм (зеленый); Су5: $\lambda_{\text{погл}} = 649$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 670$ нм (красный)). Окрашенные образцы белков смешивали в эквимольном соотношении и полученную смесь анализировали методом двумерного гель-электрофореза (см. главу «Экспериментальная часть») (Схема II.1). В первом направлении белки разделяли по разнице их электрических зарядов методом изоэлектрического фокусирования (ИЭФ). Во втором направлении проводили электрофорез в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ), разделяя белки по молекулярным массам. Такой подход позволяет достичь высокой степени разрешения белков.

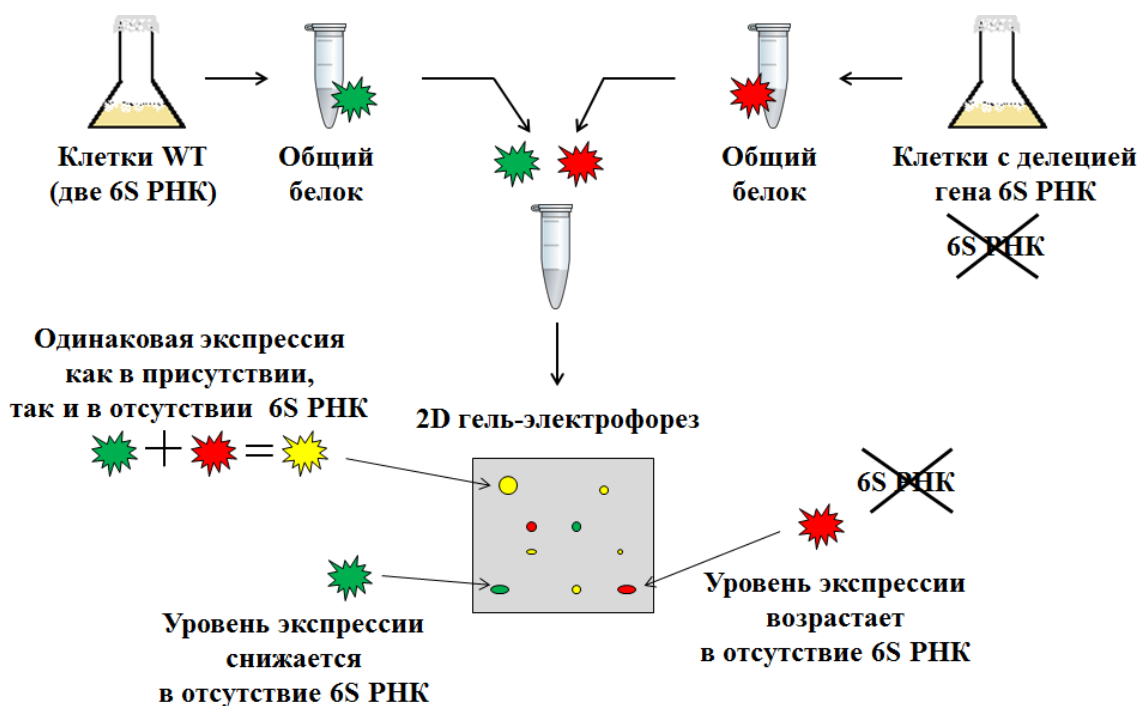


Схема II.1.

Дифференциальное мечение белковых фракций из двух клеточных линий флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5 позволяет довольно точно детектировать изменения концентрации конкретных белков. 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 (Схема II.1).

На рис. II.37 приведены изображения гелей после двумерного электрофореза в случае, когда общую белковую фракцию из клеток «дикого» типа, выделенную в экспоненциальной фазе роста, метили красителем Cy3 (зеленая флуоресценция), а из клеток штамма *ΔbsrA* или *ΔbsrB* – красителем Cy5 (красная флуоресценция).

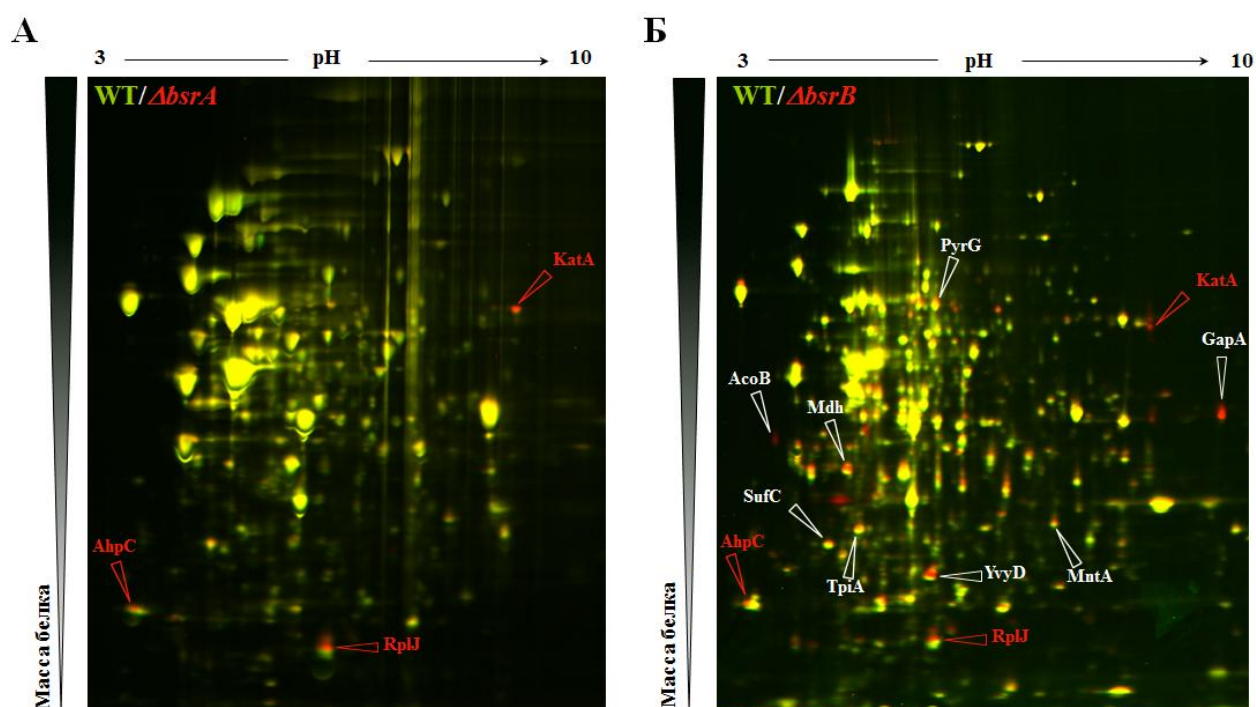


Рис. II.37. Сравнительный протеомный анализ белковых фракций, выделенных из клеточных линий *B. subtilis* дикого типа (PY79) и мутантных штаммов *ΔbsrA* (А) и *ΔbsrB* (Б) в экспоненциальной фазе роста ($A_{600} \sim 1$ О.Е.). Зоны красного и зеленого цвета на двумерном геле соответствуют белкам, уровень экспрессии которых, соответственно, увеличивается или уменьшается, при делеции гена *bsrA* или *bsrB*. 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.

Экспрессия большинства детектируемых белков несущественно изменяется в отсутствие 6S-1 РНК (рис. II.37А, желтые зоны), поскольку концентрация этой нкРНК в экспоненциальной фазе роста клеток низка. Тем не менее, выявлено как минимум три белка, эффективность синтеза которых увеличивалась в клетках *ΔbsrA* (рис. II.37А, красные зоны). После окрашивания геля раствором солей серебра, соответствующие этим белкам зоны вырезали из геля и подвергали трипсинолизу с последующим анализом полученных пептидов методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. В результате были

идентифицированы белки AhpC, RplJ и KatA (табл. II.3). Уровень их экспрессии повышался и в отсутствие 6S-2 РНК (рис. II.37Б). Однако, при делеции гена *bsrB* были заметны гораздо более существенные изменения в клеточном протеоме по сравнению с клетками дикого типа – резко возрастало количество зон красного цвета, относящихся к белкам, более эффективно экспрессирующимся в нокаутной клеточной линии *ΔbsrB*. Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF помимо белков AhpC, RplJ и KatA было идентифицировано ещё 8 характерных белков: AcoB, , Mdh, MntA, PyrG, SufC, TriA и YvyD (рис. II.37Б, табл. II.3 и II.4)

Отметим, что в ходе экспериментов не было зафиксировано белков, полностью отсутствующих в одной из клеточных линий, например, не экспрессирующихся в присутствии 6S РНК, что свидетельствует о невозможности 100%-ного ингибирования экспрессии того или иного белка с помощью 6S-1 или 6S-2 РНК. Это ожидаемый результат. 6S РНК-зависимое ингибирование лишь косвенно связано с уровнем экспрессии каждого конкретного гена, так как «мишенью» 6S РНК является РНКП. Присутствие на двумерном геле зон зеленого цвета (соответствующих белкам, эффективность синтеза которых увеличивалась в присутствии 6S РНК) может быть обусловлено снижением уровня экспрессии генов, кодирующих транскрипционные репрессоры или другие белки, вовлеченные в регуляторные процессы.

Таблица II.3. Белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, экспрессия которых регулируется обеими 6S 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 ²⁴	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 АТФ, 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

²⁴ Суперсемейство консервативных транспортных белков ABC (ATP-binding cassette).

Таблица II.4. Белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, экспрессия которых регулируется только 6S-2 РНК.

Белок	Предполагаемая функция
АсoВ – ацетиндегидрогеназа	Превращение ацетона в диметилглиоксаль
GapA – глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа	Окисление глицеральдегид-3-фосфата (гликолиз)
PyrG – СТР-синтетаза	Синтез СТР

Поскольку максимальная концентрация 6S-1 РНК приходится на раннюю стационарную фазу, наиболее заметные изменения в протеоме *ΔbsrA* следовало ожидать именно на этой стадии клеточного роста. Действительно, уровень экспрессии многих белков в клетках *ΔbsrA* возрастал по сравнению с клетками дикого типа, однако наблюдаемый эффект был слабее предполагаемого (рис. II.38А). 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.

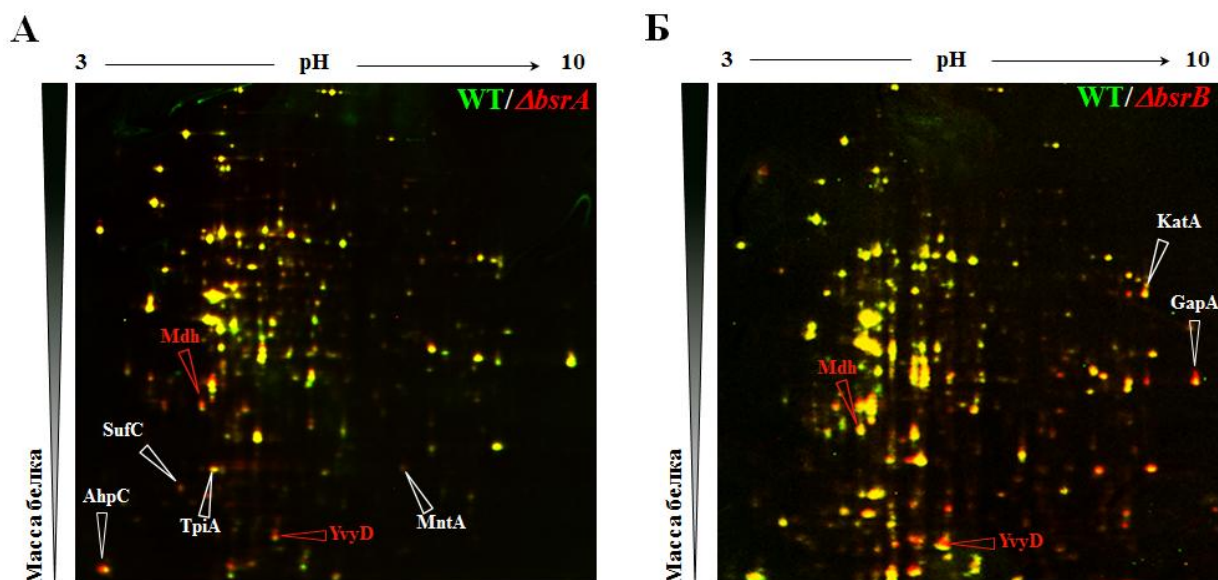


Рис. II.38. Сравнительный протеомный анализ белковых фракций, выделенных из клеточных линий *B. subtilis* дикого типа (PY79) и мутантных штаммов *ΔbsrA* (А) и *ΔbsrB* (Б) в стационарной фазе роста клеток ($A_{600} \sim 4$ О.Е.). Зоны красного и зеленого цвета на двумерном геле соответствуют белкам, уровень экспрессии которых, соответственно, увеличивается или уменьшается, при делеции гена *bsrA* или *bsrB*. Идентифицированные с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF белки подписаны. Красным шрифтом выделены названия белков, экспрессия которых ингибируется обеими 6S РНК, белым – только одной из 6S РНК.

Несмотря на то, что концентрация 6S-2 РНК в стационарной фазе роста клеток относительно низка, делеция гена *bsrB* в данном случае также вызывает заметные изменения с клеточном протеоме (рис. II.38Б). Интересно, что экспрессия некоторых белков 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 IvyD (табл. II.3). 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 *bsbB*, обусловленный одновременным возрастанием экспрессии белков, зависящей и от наличия в клетке как 6S-1, так и 6S-2 РНК (данные не приведены).

Для исключения вероятности детекции «ложных» результатов, связанных с влиянием флуоресцентной группы было проведено так называемое «перекрестное мечение» образцов белков из сравниваемых клеточных линий. Например, общую белковую фракцию из штамма *ΔbsrB* метили красителем Cy3, а из клеток дикого типа – Cy5. Изображение двумерного геля сравнивали с полученным ранее, где белки из клеток *ΔbsrB* содержали краситель Cy5, а из клеток дикого типа – Cy3, и проводили соотнесение зон красного и зеленого цвета в обоих случаях. Характерные красные зоны, присутствующие на рис. П.39А, соответствовали зеленым зонам на рис. П.39Б, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

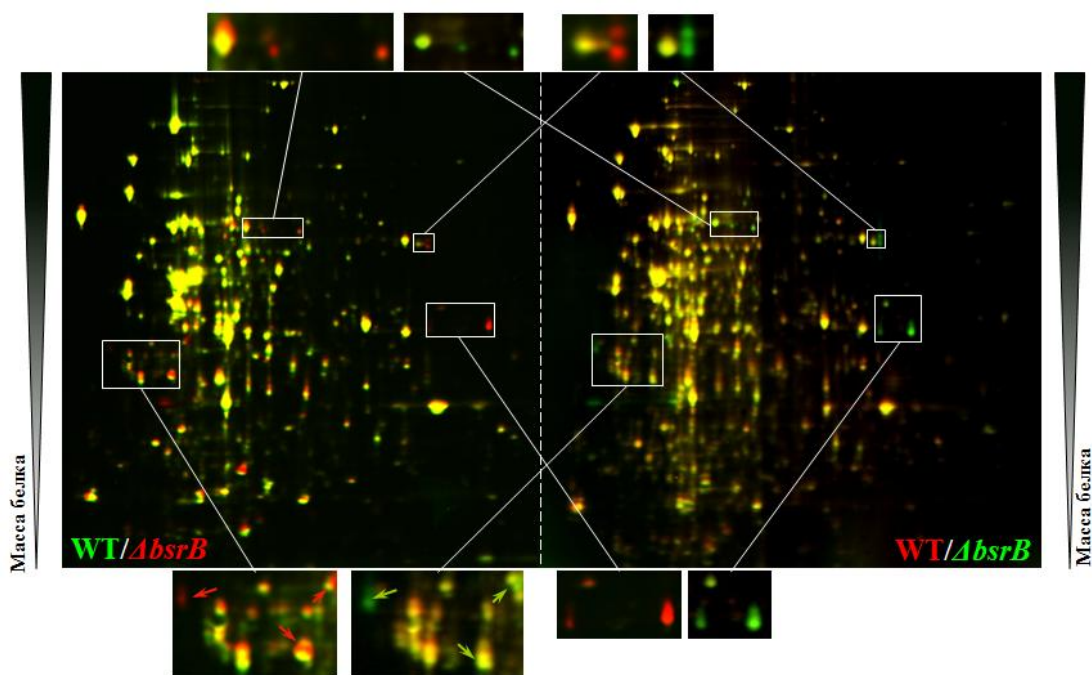


Рис. П.39. «Перекрестное мечение» белков из клеточных линий *B. subtilis* PY 79 (WT)-Cy3/*ΔbsrB*-Cy5 (А) и *B. subtilis* PY 79 (WT)-Cy5/*ΔbsrB*-Cy3 (Б). Наиболее иллюстративные области гелей увеличены.

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*. Ингибирующее влияние 6S-1 РНК на биосинтез белков оказалось менее заметным, возможно, из-за того, что при переходе в стационарную фазу экспрессия части белков уменьшается в связи с отсутствием достаточного количества питательных веществ. Больше количество белков с измененным уровнем экспрессии было зафиксировано в

случае делеции гена *bsrB*, кодирующего 6S-2 РНК. Обнаруженный факт представляет определенный интерес. Если обе 6S РНК одинаково эффективно связывают РНКП (см. раздел II.3) и ингибирование экспрессии того или иного гена сводится лишь к конкуренции между 6S РНК и промотором ДНК за образование комплекса с ферментом, то остается неясным, как объяснить появление белков (например, AcoB, GarA и PrgG), экспрессия которых изменяется в отсутствие только 6S-2 РНК. Возможно, это связано с отличиями в механизмах действия 6S-1 и 6S-2 РНК, в том числе и с обнаруженными нами особенностями синтеза пРНК, описанными в разделе II.5. Анализируя функции идентифицированных белков (табл. II.3 и 4), можно сказать, что большинство из них участвуют в процессах метаболизма и адаптации клетки к стрессовым условиям, то есть отсутствуют в клетке в «спокойном» состоянии. Безусловно, отдельно взятые белки не могут однозначно охарактеризовать биологические функции 6S-1 РНК и 6S-2 РНК в клетке. Кроме того, уровень их экспрессии может изменяться в присутствии 6S РНК лишь косвенно – за счет ингибирования или активации синтеза факторов транскрипции или трансляции белковой природы. Однако нами впервые установлена физиологическая роль 6S-1 РНК и 6S-2 РНК *B. subtilis* как регуляторов экспрессии генов.

ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

III.1. Реактивы и материалы

Реактивы: : агароза, агар, дрожжевой экстракт, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), N,N'-метиленабисакриламид, мочеви́на, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), перхлорат лития, додецилсульфат натрия (ДСН), трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис), хлорид натрия, триптон, акриламид, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоно́вая кислота (HEPES), ацетат натрия (AcONa), персульфат аммония (APS), октилфенокполиэтоксиглико́л (Nonidet P-40), хлорид магния, карбонат натрия (Хеликон, Россия); рибонуклеозидтрифосфаты (АТР, СТР, УТР, GTP), пироглутаматаза, гуанозин (Thermo Fisher Scientific, США); лизин, ингибитор протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Швейцария); спермидин, ампицилин, спектиномицин, хлорамфеникол, канамицин, изопропанол, фенол (Carl Roth GmbH, Германия); формалин, трифторуксусная кислота (ТФУ), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США); пентагидрат тиосульфата натрия, нитрат серебра (Merck, Германия); глицерин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Serva, Германия); ацетонитрил, гидрокарбонат аммония (Panreac, Испания); имидазол (AppliChem, Германия); [γ - 32 P]-АТР, [γ - 32 P]-GTP и [α - 32 P]-NTP с удельной радиоактивностью 4000 Кюри/ммоль (ВО Изотоп, Россия); гепарин (Ферейн, Россия); амфолины 3–10 (BioRad, США); гидроксисукцинимидные эфиры флуоресцентных красителей Cy3 и Cy5 (BioDye, Россия); ацетон (Химмед, Россия); CHAPS (3-[(3-холиламидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат) (Amresco, США); гексацианоферрат (II) калия (Рехим, Россия); Ni²⁺-NTA-агарозная суспензия (QIAGEN, Германия); декстроза (D-глюкоза) (Sigma-Aldrich, США); бромид этидия (EtBr) (Calbiochem-Behring Corporation, США); уксусная кислота, трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (1,4-дителиотреит, ДТТ) (Fluka, Швейцария); хлороформ, этиловый спирт (EtOH) (Merck, Германия); изоамиловый спирт (Life Technologies, США); маркеры-красители бромфеноловый синий (БФС) и ксиленианол (КЦ) (Reanal, Венгрия); белковый маркер: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, буферы для нанесения в гель: RNA Loading Dye, DNA Loading Dye, Orange DNA Loading Dye, маркер РНК: RiboRuler™ RNA Ladder Low Range, маркеры ДНК: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Остальные реактивы – коммерческие препараты отечественного производства.

Ферменты и белки. Препарат T7 РНКП (~ 40 ед. акт./мкл) был любезно предоставлен проф. Р. Хартманном (Марбургский университет имени Филиппса, Германия). В работе также были использованы T4-полинуклеотидкиназа, Taq-полимераза, эндонуклеазы рестрикции EcoRI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США); лиозим

(Amresco, США); трипсин (Promega, США); рибонуклеаза А (РНКаза А) (Хеликон, Россия); нуклеаза I (ДНКаза I) (Roche, Швейцария).

Клеточные линии *B. subtilis* 168, *B. subtilis* PY79, нокаутные клеточные линии *B. subtilis* PY79 ($\Delta brsA$, $\Delta brsB$, $\Delta brsAB$, $\Delta brsAB+A$, $\Delta brsA+B$), а также клетки *E. coli* DH5 α были любезно предоставлены проф. Р. Хартманном (Марбургский университет имени Филиппса, Германия). Клеточная линия *B. subtilis* NA110 была любезно предоставлена проф. М. Салас (Центр молекулярной биологии имени С. Очоа, Автономный Университет Мадрида, Испания). В работе также использовали коммерчески доступные клетки *B. subtilis* MH5636 (Bacillus Genetic Stock Center, США) (табл. III.1).

Таблица III.1. Клеточные линии *E. coli* и *B. subtilis*, использованные в работе.

Клеточная линия	Генотип [†]
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA1 gyrA endA1 relA1supE44 hsdR17</i>
<i>B. subtilis</i> MH5636	<i>trpC2 pheA1 10\times<i>His-rpoC</i></i>
<i>B. subtilis</i> NA110	<i>trpC2 spo0A3 su</i> ⁻
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>
<i>B. subtilis</i> PY79	<i>Trp</i> ⁺ , <i>SP</i> β ⁻ (прототроф)
<i>B. subtilis</i> MW Δ <i>brsA</i>	PY79 Δ <i>brsA::spc</i> (Sp [†])
<i>B. subtilis</i> MW Δ <i>brsB</i>	PY79 Δ <i>brsB::kan</i> (Km [†])
<i>B. subtilis</i> MW Δ <i>brsAB</i>	PY79 Δ <i>brsA::spc</i> (Sp [†]) Δ <i>brsB::kan</i> (Km [†])
<i>B. subtilis</i> MW Δ <i>brsAB+A</i>	MW Δ <i>brsAB</i> pDG364 <i>brsA</i> (Cm [†])
<i>B. subtilis</i> MW Δ <i>brsAB+B</i>	MW Δ <i>brsAB</i> pDG364 <i>brsB</i> (Cm [†])

[†]-устойчивость к антибиотикам: спектиномицину (Sp[†], 100 мкг/мл), канамицину (Km[†], 10 мкг/мл) или хлорамфениколу (Cm[†], 5 мкг/мл) соответственно.

Олигодезоксирибонуклеотиды. В качестве праймеров для ПЦР в работе были использованы коммерческие олигодезоксирибонуклеотиды (Integrated DNA Technologies, США и Ноххон, Германия). Часть праймеров была синтезирована стандартным амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (БИОССЕТ, Россия) с.н.с., к.х.н. Романовой Е.А. (НИИ ФХБ МГУ имени М.В. Ломоносова). Очистку праймеров проводили методом гель-фильтрации на колонках Illustra[™] NAP-5 (GE Healthcare, США) и с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (7 М мочевины).

Плазмиды pNG132, pNG219, pNG540, pNG545 и pNG567 для выделения кор-фермента РНКП и σ^A -субъединицы *B. subtilis* любезно предоставлены проф. Р. Льюисом (Ньюкаслский университет, г. Каллахен, Австралия). Плазмида pUC18 любезно предоставлена проф. Р. Хартманном (Марбургский университет имени Филиппса,

Германия). Плазмиды pBB_T7_bsrA и pBB_T7_bsrB сконструированы в данной работе на основе вектора pUC18 (табл. III.2).

Таблица III.2. Плазмиды, использованные в работе.

Плазида	Генотип [†]
pUC18	pMB1(Ap ^r)
pBB_T7_bsrA	φ10 <i>bsrA</i> (Ap ^r)
pBB_T7_bsrB	φ10 <i>bsrB</i> (Ap ^r)
pNG132	<i>bla P_{φ10}-6×His-sigA-T_φ</i> (Ap ^r)
pNG219	<i>bla P_{φ10}-rpoA-rpoB-rpoC-9×His-T_φ</i> (Ap ^r)
pNG540	<i>bla P_{φ10}-yloH-rpoC-9×His-T_φ</i> (Ap ^r)
pNG545	<i>cat lacI P_{φ10lac}-rpoA-rpoB-T_φ</i> (Cm ^r)
pNG567	<i>bla P_{φ10}-ykhzG-rpoC-9×His-T_φ</i> (Ap ^r)

[†]-устойчивость к антибиотикам: ампициллину (Ap^r, 100 мкг/мл) или хлорамфениколу (Cm^r, 30 мкг/мл), *P_{φ10}* – T7-фаговый промотор, *T_φ* – терминатор T7-транскрипции

Буферные растворы:

VI: 50 mM Трис–HCl (pH 8,4), 10 mM MgCl₂, 1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол

VII: 25 mM Трис–HCl (pH 8,4), 1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 15 % (V/V) глицерина

VIII: 25 mM Трис–HCl (pH 8,4), 1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 50 % (V/V) глицерина

LAP: 50 mM Трис–HCl (pH 6,8), 2,5% (m/V) ДСН, 10% (V/V) глицерина, 0,5% (V/V) β-меркаптоэтанола, 0,01% (m/V) БФС

TE: 10 mM Трис (pH 8,0), 1 mM ЭДТА

TBE: 50 mM Трис–H₃BO₃ (pH 8,3), 1 mM ЭДТА

TBS: 50 mM Трис–HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

TG: 25 mM Трис–HCl (pH 8,3), 250 mM глицин, 0,1% (m/V) ДСН

LM: 0,2 M Трис–HCl (pH 8,0), 25 mM MgCl₂, 0,8 M KCl, 5 mM ДТТ

SD: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 150 mM NaCl, 20% (V/V) глицерина

SE: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 250 mM имидазол

SL: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, 0,5 мг/мл лизоцима

SW: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM имидазол

R: 20 mM KH₂PO₄ (pH 8,0), 500 mM NaCl, 20 mM имидазол

RD: 20 mM Трис–HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА

RS: 20 mM Трис–HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 30% (V/V) глицерина

SW1: 300 M NaCl, 30 mM цитрат натрия, 0,1% ДСН, pH 7,0

SW2: 15 mM NaCl, 1,5 mM цитрат натрия, 0,1% ДСН, pH 7,0

Буфер А: 125 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 6 М мочевины, 30% (V/V) глицерина, 2% (m/V) ДСН

Буфер Б: 50 мМ NH₄НСО₃ (рН 7,8), 40% (V/V) ацетонитрила

Буфер В: 100 мМ NH₄НСО₃ (рН 7,8)

Буфер Г: 50 мМ Na₂НРО₃ (рН 7,1), 300 мМ NaCl, 3 мМ 2-меркаптоэтанол, 5% (V/V) глицерина

Буфер Д: 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 3 мМ 2-меркаптоэтанол, 50% (V/V) глицерина

Буфер Е: 80 мМ НЕРЕС (рН 8,0), 15 мМ ДТТ, 33 мМ MgCl₂, 1 мМ спермидина

Буфер Ж: 30 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% (V/V) CHAPS/ Nonidet P-40

Водные растворы:

Р1: 80% (V/V) формамида, 0,025% (m/V) БФС, 0,025% (m/V) КЦ

Р2: 10% (V/V) уксусной кислоты, 20% (V/V) этилового спирта

Р3: 0,1% (m/V) AgNO₃, 3,7% (m/V) формальдегида

Р4: 4% (m/V) Na₂СО₃, 6×(10⁻⁴)% (m/V) Na₂S₂O₃×5Н₂O, 3,7% (m/V) формальдегида

Р5: 0,2 М Na₂S₂O₃, 30 мМ K₄[Fe(CN)₆]

Р6: 0,130 мМ N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодимид гидрохлорида (EDC), 0,160 мМ 1-метилимидазола, рН 8,0

Р7: 30% (m/V) CHAPS, 10% (m/V) Nonidet P-40

Питательные клеточные среды, на 1 л воды:

LB: 5 г NaCl, 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта (рН 7,5)

LBD: 5 г NaCl, 5 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 10 г декстрозы (рН 7,5)

LB-агар: 5 г NaCl, 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 15 г агара (рН 7,5)

Вода различной степени очистки:

ddH₂O – бидистиллированная вода (дистиллят). Использовалась для приготовления буферов для электрофореза и питательных сред.

Milli-Q H₂O – вода, очищенная с помощью прибора для фильтрации (EMD Millipore, США). Использовалась для приготовления всех растворов для реакционных смесей с участием РНК и ДНК.

CHROMASOLV H₂O (Sigma-Aldrich, США) – вода для хроматографии. Использовалась для приготовления всех растворов для проведения 2D-электрофореза белков (если не указано иное) и их последующего выделения для идентификации.

III. 2. Приборы и методы

Микрообъемы растворов дозировали автоматическими дозаторами Pipetman (Gilson, Франция) с точностью 5%. Центрифугирование образцов в пробирках объемом 0,5 мл и 1,5 мл проводили на микроцентрифугах Costar (США) и Eppendorf (Германия). Клеточные культуры центрифугировали в пробирках объемом 50 мл или стаканах. Клеточные культуры центрифугировали в пробирках объемом 50 мл или стаканах объемом 250 мл в настольной центрифуге Eppendorf (Германия). Измерение pH растворов проводили на лабораторном pH-метре модели РВ-11 (Sartorius, Германия) с точностью до 0,01 единицы pH. Термостатирование проб проводили в термостатах Термит (ДНК-технология, Россия) и Thermocycler T1 (Biomtra, Германия). Питательные среды, растворы для выделения белков и лабораторный пластик для работы с РНК автоклавировали в автоклаве модели 2540 МК (Tuttnauer, Израиль-США).

Выращивание клеточных культур *B. subtilis* и *E. coli*. Клетки из глицериновых стоков (-80°C) инокулировали на чашках Петри с питательной средой **LB-агар**, содержащей необходимое количество соответствующего антибиотика. После 12-18-часовой инкубации при 37°C чашки герметично закрывали и помещали на 4°C. Для инокуляции ночных культур (5 мл, **LB**), содержащих необходимое количество соответствующего антибиотика, отбирали единичные колонии с чашек Петри.

Спектры поглощения клеточных культур в УФ-области записывали на спектрофотометре CARY 50 Bio UV-Visible (Varian, США) длине волны 595 нм в одноразовых полистироловых кюветах (Sarstedt, Германия).

Спектры поглощения водных растворов фрагментов ДНК и РНК в УФ-области записывали на спектрофотометре CARY 50 Bio UV-Visible (Varian, США) при длине волны 260 нм. Использовали кювету TrayCell (Hellma Analytic, США). Объем проб составлял 5 мкл. Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически по формуле Бугера-Ламберта-Бера: $C = A_{260}/(\epsilon_{260} \times l)$, где C – концентрация нуклеотидного материала, M ; A_{260} – оптическая плотность раствора при 260 нм; ϵ_{260} – молярный коэффициент экстинкции при 260 нм, $M^{-1}cm^{-1}$; l – длина оптического пути, 0,1 см. Молярные коэффициенты экстинкции олигонуклеотидов и фрагментов РНК рассчитывали с помощью программы OligoAnalyzer 3.1 (SciTools, www.idtdna.com). Молярные коэффициенты экстинкции (ϵ_{260}) ПЦР-фрагментов рассчитывали с помощью соответствующего приложения на сервере <http://biophysics.idtdna.com/>.

Электрофорез ПЦР-фрагментов и плазмидных ДНК в неденатурирующих условиях проводили в плоском $12,5 \times 8,5 \times 0,4$ см агарозном геле, содержащем 1% агарозы в **ТВЕ**-буфере с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при напряженности поля 5 В/см. Перед нанесением в гель пробы (5-10 мкл) смешивали с 1-2 мкл 6-кратного раствора Orange DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США). После электрофореза гели фотографировали под УФ-светом ($\lambda=365$ нм).

Электрофорез олигодезоксирибонуклеотидов и РНК-фрагментов в денатурирующих условиях проводили в 25%-ном (для пРНК), 20%-ном (для олигодезоксирибонуклеотидов), 8%-ном (для 6S РНК) или 5%-ном (для продуктов транскрипции) ПААГ ($20 \times 20 \times 0,1$ см), содержащем 19% (*m/V*) акриламида, 1% (*m/V*) *N,N'*-метиленбисакриламида и 7 М мочевины, в **ТВЕ**-буфере при напряженности поля 50 В/см. Префорез проводили в течение 30 мин, электрофорез – в течение 1-8 ч. Пробы наносили на гель в 20-30 мкл раствора **P1** в случае олигодезоксирибонуклеотидов или в 20 мкл буфера для нанесения в гель RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США) в случае РНК.

Элюция олигодезоксирибонуклеотидов из геля. К фрагментам геля, содержащим олигодезоксирибонуклеотиды добавляли 200 мкл 2 М LiClO₄ и инкубировали 16-18 ч при комнатной температуре. Затем отбирали раствор, промывали гель 100 мкл 2 М LiClO₄, объединяли с первой фракцией и добавляли ацетон до объема 1,5 мл. Полученный раствор центрифугировали 2 мин при 14500 об./мин, жидкость над осадком отбирали. К осадку добавляли 50 мкл 2 М LiClO₄ и 500 мкл ацетона, центрифугировали 2 мин при 14500 об./мин, отбирали жидкость, добавляли к осадку 500 мкл ацетона и снова центрифугировали. Промывку ацетоном повторяли. После высушивания на воздухе осадок растворяли в Milli-Q H₂O и определяли концентрацию олигодезоксирибонуклеотидов спектрофотометрически.

Экстракция ДНК и РНК из водных растворов. К раствору ДНК или РНК добавляли эквивалентный объем фенола, насыщенного **TE**-буфером (рН 8,0) или 300 мМ раствором AcONa (рН 4,9) соответственно. Смесь энергично встряхивали и центрифугировали 5 мин на скорости 13500 об./мин при комнатной температуре, затем водную фазу отбирали в новую пробирку и добавляли эквивалентный объем хлороформа и повторяли процедуру. Целевые ДНК и РНК из полученной водной фазы осаждали 2,5 объемами предварительно охлажденного (-20°C) абс. EtOH в присутствии 0,3 М AcONa, инкубировали при -20°C не менее 2 ч, центрифугировали (5 мин, 13500 об./мин, 4°C) и после высушивания на воздухе (~ 5 мин) растворяли в Milli-Q H₂O.

Выделение общей РНК из различных клеточных линий *B. subtilis* («горячий фенольный» метод). Для выделения больших количеств общей клеточной РНК использовали «горячий фенольный» метод, описанный в работе [155]. Клеточный осадок (из 25-100 мл клеточной культуры) энергично ресуспендировали в 12 мл охлажденного (4°C) буфера для экстракции (10 mM NaOAc, pH 4,8, 150 mM сахарозы) на «вортексе». Затем к клеточной суспензии добавляли 400 мкл раствора лизоцима (20 мг/мл) в **TE**-буфере и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После добавления 1,3 мкл 10%-ного раствора ДСН и 3 мл подогретого до 65°C фенола (насыщенного 10 mM NaOAc, pH 4,8) смесь энергично перемешивали с последующей инкубацией при 65°C (5 мин), и при 4°C (5 мин, в бане со льдом), а затем центрифугировали (20 мин, 12000 об./мин, 4°C). Верхнюю водную фазу отбирали в чистую пробирку и проводили фенол/хлороформную экстракцию с последующим осаждением РНК этанолом. Осадок выделенной общей РНК растворяли в 20-100 мкл ddH₂O, определяли спектрофотометрически концентрации растворов РНК, замораживали их в жидком азоте и хранили при -80°C.

Определение концентрации белков в препаратах методом Брэдфорд проводили по стандартной методике в двух различных вариантах. В обоих случаях вначале строили калибровочную прямую величин поглощения растворов БСА заданных концентраций. В первом варианте к 800 мкл водного раствора БСА заданной концентрации (1-8 мкг/мл) или водного раствора РНКП *B. subtilis* добавляли 200 мкл реагента Protein Assay Dye Reagent Concentrate («Bio-Rad», США), перемешивали и через ~ 5 мин записывали спектр поглощения раствора на спектрофотометре CARY 50 Bio UV-Visible при длине волны 595 нм. Во втором случае 5 мкл водного раствора БСА заданной концентрации (100-1500 мкг/мл) или 5 мкл водного раствора препарата белка для последующего 2D-гель-электрофореза смешивали с 250 мкл реагента Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent («Thermo Fisher Scientific», США) в плоскодонном 96-луночном планшете и через 5 мин записывали спектр поглощения раствора на иммуноферментном планшетном анализаторе StatFax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм.

Электрофорез белков и клеточных лизатов (гель-электрофорез по Лэммли) проводили в ПААГ (10×10×0,1 см), содержащем 0,1% (m/V) ДСН, в буфере **TG** при напряженности поля 20 В/см. Разделяющий гель (15%): 15% (m/V) акриламида, 0,52% (m/V) N,N'-метиленабисакриламида, 0,1% (m/V) ДСН, 375 mM Трис-НСl (pH 8,8). Концентрирующий гель (4%): 3,66% (m/V) акриламида, 0,13% (m/V) N,N'-метиленабисакриламида, 0,1% (m/V) ДСН, 125 mM Трис-НСl (pH 6,8). Пробы наносили на гель в 20 мкл буфера **LAP** после предварительного прогрева в течение 3–5

мин при 95°C. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков по коммерческому протоколу раствором PageBlue™ на основе кумасси бриллиантового синего G-250 (Thermo Fisher Scientific, США).

Двумерный белковый гель-электрофорез. Равные (по суммарной величине флуоресценции) количества сравниваемых образцов белков смешивали (~ 30-40 мкл) и добавляли 0,8 мкл 50%-ного водного раствора ДТТ (финальная концентрация (Ф. к.) 1% (*m/V*)) и 0,8 мкл раствора амфолинов 3-10 (Ф. к. 1% (*V/V*), BioRad, США). ИЭФ проводили в камере для электрофореза Protean II xi 2-D Cell (BioRad, США) с использованием стеклянных капилляров длиной 180 мм, заполненных 4%-ным ПААГ (8 М мочевины, 5% (*m/V*) амфолинов 3-10, 2,4% (*m/V*) каждого из неионных детергентов CHAPS/Nonidet P-40). Для ИЭФ использовали следующую программу: линейный градиент напряжения от 200 до 600 В – 6 ч, затем 700 В – 10 ч и 900 В – 10 ч. Полученные после ИЭФ гели извлекали из капилляров и выдерживали в течение 30 мин в буфере А. Затем разделяли белки по массам в стандартном 12%-ном ДСН-ПААГ геле в камере для электрофореза Protean II xi 2-D Cell (BioRad, США), используя следующую программу (для 12 гелей одновременно): 30 мА – 20 мин, 70 мА – 2 ч, 60 мА – 4 ч. Детекцию белков осуществляли при помощи сканера флуоресценции Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare, США). Расчет соотношений белков в образцах проводили по соотношению флуоресценции красителей Cy3 и Cy5, введенных в белки.

Окрашивание гелей раствором нитрата серебра. После проведения двумерного электрофореза белки фиксировали в геле раствором **P2** (не менее 1 ч), промывали ddH₂O (3 раза по 15 мин), обрабатывали раствором Na₂S₂O₃ в воде (0,3 г/л) и снова промывали ddH₂O (2-3 раза по 10 мин). Затем гели выдерживали в растворе **P3** в течение 10-15 мин, промывали ddH₂O (2 раза по 30 с) и добавляли раствор **P4**. Окрашивание останавливали 10%-ной CH₃COOH. Перед фотографированием гели промывали ddH₂O.

Введение радиоактивной ³²P-метки на 5'-конец фрагментов РНК проводили инкубируя 60 пмоль РНК-фрагмента с 10 ед. акт. Т4-полиинуклеотидкиназы (Thermo Fisher Scientific, США) и 3 мкл [γ -³²P]АТФ в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ и 0,1 мМ спермидин (общий объем реакционной смеси 15 мкл). Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин. Меченые фрагменты РНК очищали методом гель-фильтрации на колонках G-25 Illustra MicroSpin™ (GE Healthcare, США) или с помощью электрофореза в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевины) с последующей элюцией и осаждением этанолом.

Радиоактивность ^{32}P -меченых препаратов определяли методом счёта по Черенкову в импульсах в минуту на счетчике Tracor Analytic Delta 300 (ThermoQuest CE Instruments, США). Ошибка счёта не превышала 2%.

Визуализацию радиоактивных полос в геле и обсчет данных проводили на приборе Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm Medical Systems Inc., США), используя компьютерную программу Aida Image Analyzer 3.44.035.

Визуализацию флуоресценции меченых флуоресцентными красителями белков проводили на приборе Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare, США).

Подготовка проб белков для MALDI анализа. Положение сигналов флуоресценции того или иного белка сопоставляли с фотографией ПААГ после прокрашивания раствором соли серебра. Нужные зоны вырезали из геля с помощью обрезанных по диаметру белкового «пятна» стерильных наконечников для автоматического дозатора. Осажденное серебро в вырезанном фрагменте растворяли в свежеприготовленном растворе **P5** (~ 10 мкл). Затем фрагмент геля промывали 100 мкл CHROMASOLV H_2O и 100 мкл буфера **Б** (2 раза по 20 мин), добавляли 100 мкл ацетонитрила и через 5 мин инкубации при комнатной температуре отбирали жидкость. Образцы сушили на воздухе в течение 5-10 мин, а затем добавляли 4-10 мкл раствора трипсина (0,05-0,125 мкг/мкл) в буфере **В** в зависимости от величины фрагмента геля и инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением эквимольного количества 0,5% раствора ТФУ (V/V).

Масс-спектры MALDI-TOF были получены и расшифрованы с.н.с. Серебряковой М.В. (НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) на MALDI-TOF-масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали 3-гидроксипиколиновую кислоту и гидроцитрат диамония. Белки определяли по наборам масс протеолитических пептидов, последовательности которых идентифицировали с помощью базы данных US National Center for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), содержащей полные геномы исследуемых штаммов *B. subtilis*.

III. 3. Общие методики

Получение химически компетентных клеток *E. coli* DH5 α . Ночную культуру клеток *E. coli* DH5 α (3 мл) разбавляли 100 мл свежей питательной среды **LB** и выращивали при перемешивании 220 об./мин до достижения оптической плотности $A_{600} \sim 0,5-0,7$ О.Е. Затем клеточные культуры охлаждали в бане со льдом в течение 5 мин

и центрифугировали (5 мин, 4000 об./мин, 4°C) для осаждения клеток. Клеточную биомассу ресуспендировали в 30 мл охлажденного (4°C) раствора 100 мМ CaCl₂, инкубировали 5 мин в бане со льдом и повторно центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 3 мл раствора 75 мМ CaCl₂, содержащего 25% (V/V) глицерина, отбирали аликвоты объемом 50 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C.

Трансформация плазмид в клетки *E. coli* DH5 методом теплового шока. Химически компетентные клетки *E. coli* DH5 (50 мкл) размораживали в бане со льдом, добавляли 5 мкл реакционной смеси после лигирования ДНК или 20 нг очищенной плазмиды и инкубировали при 4°C в течение 20 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку (30 с, 42°C) и вновь инкубировали в бане со льдом в течение 2 мин. После добавления 600 мкл свежей питательной среды **LB** и культивирования 1 ч при 37°C аликвоту клеточной суспензии объемом 100 мкл наносили на чашку Петри с **LB-агаром**, содержащим 100 мкг/мл ампициллина и выращивали при 37°C в течение 18 ч для последующей селекции трансформированных клеточных колоний.

Выращивание клеток *B. subtilis* 168, PY79, *dbsrA*, *dbsrB*, *dbsrAB*, *dbsrAB+A* и *dbsrAB+B* для построения кривых клеточного роста и выделения общей РНК. Аликвоты ночных культур клеток *B. subtilis* ($A_{600} \sim 4-5$ О.Е.), выращенных в присутствии необходимых антибиотиков (кроме клеток дикого типа, см. табл. 1) разбавляли 500 мл свежей питательной среды **LB** до $A_{600} \sim 0,02$ О.Е. и культивировали при 37°C (220 об./мин) в отсутствие антибиотиков в течение 48 ч. Через промежутки времени 3, 4,5, 6, 10, 24, 36 и 48 ч отбирали аликвоты объемом 25 мл. Для моделирования стадии выхода из стационарной фазы аликвоту клеточной культуры объемом 20 мл после 24 ч выращивания разбавляли 80 мл свежей питательной среды **LB** и культивировали при 37°C (220 об./мин) в течение 5 мин. Отобранные клетки осаждали центрифугированием (15 мин, 4000 об./мин, 4°C), жидкость над осадком удаляли. Осадок клеточной биомассы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Выращивание клеточных линий *B. subtilis* PY79, *dbsrA*, *dbsrB*, *dbsrAB*, *dbsrAB+A* и *dbsrAB+B* для выделения общего белка. Ночные культуры клеток, выращенные в среде **LB** с добавлением соответствующего антибиотика (см. табл. 1), разбавляли 100 мл свежей питательной среды **LB** до $A_{600} \sim 0,05$ О.Е. и выращивали при 37°C и перемешивании 250 об./мин. При достижении оптической плотности $A_{600} \sim 1,0$ О.Е. половину клеточной культуры (50 мл) отбирали, а оставшиеся 50 мл продолжали культивировать до достижения оптической плотности $A_{600} \sim 4,0$ О.Е. Отобранные клетки

осаждали центрифугированием (15 мин, 4000 об./мин, 4°C), жидкость над осадком удаляли. Осадок замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Выделение σ^A -субъединицы РНКП *B. subtilis*. Выделение σ^A -субъединицы РНКП *B. subtilis* проводили согласно протоколу, описанному в работе [131]. Клетки *E. coli* DH5 α , трансформированные плазмидой pNG132, культивировали в среде **LB** в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C и 220 об./мин до достижения значения оптической плотности $A_{600} \sim 0,4$ О.Е. Затем индуцировали экспрессию белка добавлением 0,5 мМ ИПТГ, и культивировали клетки еще 5 ч при 20°C и 160 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 4°C со скоростью 4000 об./мин (Eppendorf 5810R, США). Осадок ресуспендировали в буфере для лизиса **SL** в расчете 5 мл буфера на 1 г клеточной биомассы. Клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе Branson-250 (Branson Ultrasonics Corporation, США) в течение 10 мин (облучение импульсами длительностью 15 с, интервал – 15 с, 4°C) и центрифугировали 45 мин при 4°C со скоростью 8000 об./мин. Жидкость над осадком смешивали в соотношении 1:10 (V/V) с суспензией Ni²⁺-NTA-агарозы (предварительно уравновешенной буфером для лизиса **SL**) и инкубировали при медленном перемешивании 30 мин при 8°C. Далее аликвоты суспензии последовательно переносили на колонку Micro Bio-Spin™ Chromatography Column (Bio-Rad, США) и отделяли Ni²⁺-NTA-агарозу центрифугированием 30 с при скорости 2400 об./мин. Затем колонку промывали 10-тью объемами буфера **SW** и элюировали белок аликвотами буфера **SE** объемом 0,5 мл. Состав элюированных фракций анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли. Содержащие целевой белок фракции объединяли и проводили диализ при 4°C против буфера **SD**. Полученный белковый препарат хранили при -70°C.

Выделение РНКП *B. subtilis*. Выделение кор-фермента РНКП *B. subtilis* (Методика 1) проводили согласно протоколу, описанному в работе [131]. Препарат холофермента σ^A -РНКП для его последующего использования в экспериментах по транскрипции *in vitro* выделяли по упрощенной методике (Методика 2) на основе протокола, описанного в работе [132]. Для остальных экспериментов использовали тщательно очищенную σ^A -РНКП, выделенную по оригинальной методике (Методика 3), разработанной в сотрудничестве с проф. М. Салас и сотр. (Центр молекулярной биологии имени С. Очоа, Автономный Университет Мадрида, Испания).

Методика 1. Клетки *E. coli* DH5 α , трансформированные плазмидой pNG219 (для выделения не содержащего ω -субъединицу кор-фермента РНКП) культивировали в среде **LB** в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C и 220 об./мин до достижения

значения оптической плотности $A_{600} \sim 0,5$ О.Е. Затем индуцировали экспрессию белка добавлением 0,05 мМ ИПТГ, и культивировали клетки еще 5 ч при 20°C и 160 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 4°C со скоростью 4000 об./мин (Eppendorf 5810R, США). Клетки *E. coli* DH5 α , трансформированные одновременно двумя плазмидами: pNG545/540 (для выделения кор- ω 1-РНКП) или pNG545/567 (для выделения кор- ω 2-РНКП), культивировали в среде **LB**, содержащей 0,1% (*m/V*) глюкозы в ампициллина и хлорамфеникола (50 мкг/мл и 30 мкг/мкл, соответственно) при 37°C и 220 об./мин до достижения значения оптической плотности $A_{600} \sim 0,5-0,7$ О.Е. Затем индуцировали экспрессию белка добавлением 0,5 мМ ИПТГ, и культивировали клетки еще 5 ч при 20°C и 160 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 4°C со скоростью 4000 об./мин (Eppendorf 5810R, США). Дальнейшее выделение и очистку различных вариантов кор-РНКП проводили в одинаковых условиях.

Клеточную биомассу ресуспендировали в буфере **R** (в расчете 5 мл буфера на 1 г клеточной биомассы), содержащем 0,05% (*m/V*) Triton X-100, 0,5 мг/мл лизоцима и 1 мМ PMSF. Клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе Branson-250 (Branson Ultrasonics Corporation, США) в течение 10 мин (облучение импульсами длительностью 15 с, интервал – 15 с, 4°C) и центрифугировали 45 мин при 4°C со скоростью 8000 об./мин. Жидкость над осадком фильтровали с помощью мембранного фильтра из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм) и наносили на колонку His-Trap (GE Healthcare, США) объемом 1 мл, предварительно уравновешенную буфером **R**. Затем колонку промывали 10-тью мл буфера **R**, содержащего 45 мМ имидазол, и элюировали аликвотами по 0,5 мл буфера **R**, содержащего 200 мМ имидазол. Состав элюированных фракций анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли. Содержащие целевой белок фракции объединяли и проводили диализ при 4°C против буфера **RD**. Диализат наносили на колонку MonoQ (GE Healthcare, США) объемом 1 мл, предварительно уравновешенную буфером **RD**. Хроматографию проводили 10-тью объемами буфера **RD** в линейном градиенте NaCl от 150 мМ до 1 М при скорости 1 мл/мин. Фракции, содержащие целевой белок (~ 400–500 мМ NaCl) объединяли и проводил диализ при 4°C против буфера **RS**. Полученный белковый препарат хранили при -70°C.

Методика 2. Ночные культуры *B. subtilis* MH5636 ($A_{600} \sim 5-6$ О.Е.) разбавляли свежей питательной средой **LBD** (1:1000) и выращивали при 37°C в условиях интенсивной аэрации (300 об./мин) до $A_{600} \sim 1,2$ О.Е. Осажденные центрифугированием клетки (15 мин, 4000 об./мин, 4°C) ресуспендировали в буфере **Г** (в расчете 3 мл буфера на 1 г клеток),

содержащем 1 таблетку предварительно растворенного ингибитора протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Roche, США), и лизировали ультразвуком (20 циклов: облучение импульсами длительностью 15 с, интервал – 15 с) в бане со льдом. Клеточную биомассу осаждали центрифугированием (15 мин, 13500 об./мин, 4°C). К отобранной жидкости над осадком добавляли суспензию Ni²⁺-NTA-агарозы в соотношении 1:10 (V/V) и инкубировали при медленном перемешивании 30 мин при 8°C. Далее аликвоты суспензии (0,6-0,8 мл) последовательно переносили на колонку Micro Bio-Spin™ Chromatography Column (Bio-Rad, США) и отделяли Ni²⁺-NTA-агарозу центрифугированием 30 с при скорости 2400 об./мин. После этого сорбент промывали 20-тью объемами буфера Г (рис. III.1, дорожка 2) и 20-тью объемами буфера Г, содержащим 60 мМ имидазол (рис. III.1, дорожки 3-4). РНКП элюировали аликвотами по 0,5 мл буфера Г, содержащим 400 мМ имидазол (рис. III.1, дорожки 6-8). Состав собранных фракций анализировали с помощью гель-электрофореза по Лэммли (рис. III.1). Фракции, содержащие РНКП, подвергали диализу в течение 12 ч в буфере Д при 4°C и хранили при -20°C.

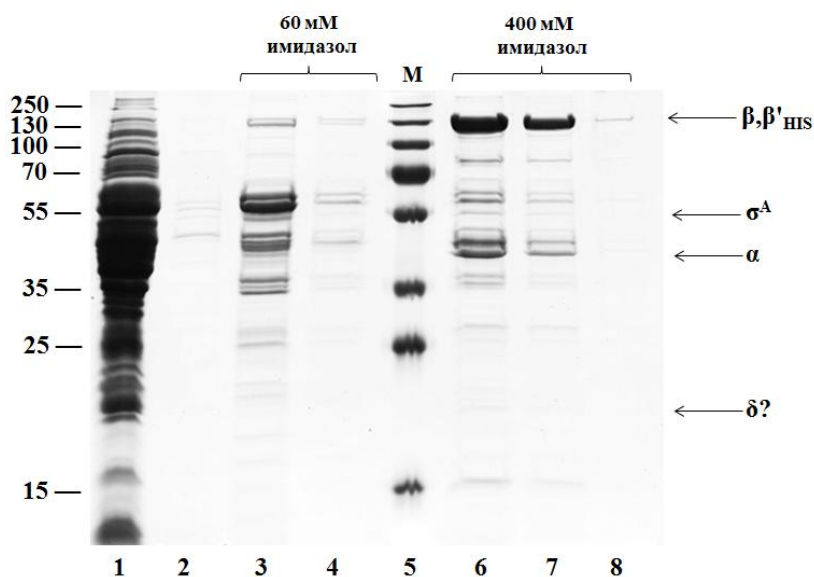


Рис. III.1. Электрофоретический анализ (15%-ный ДСН-ПААГ) состава фракций в процессе выделения РНКП *B. subtilis* методом хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Дорожка 1 – фракция, не сорбируемая на Ni²⁺-NTA-агарозе; дорожка 2 – фракция, полученная после промывки сорбента буфером Г; дорожки 3 и 4 – первая и вторая половина фракции, полученной после промывки сорбента буфером Г, содержащим 60 мМ имидазол; дорожки 6-8 – фракции, полученные в ходе элюции белка буфером Г, содержащим 400 мМ имидазол. Дорожка 5 - набор белков-маркеров молекулярной массы, кДа (указаны слева). Фотография после окрашивания раствором кумасси G-250.

Методика 3. Клетки *B. subtilis* NA110 культивировали в питательной среде **LB**, дополнительно содержащей 5 мМ MgSO₄, при 37°C в условиях интенсивной аэрации (300 об./мин), до достижения оптической плотности A₄₂₀ ~ 1,5–2 О.Е. После центрифугирования в течение 30 мин при скорости 4000 об./мин (4°C) осажденные клетки (~ 4 г/л клеточной культуры) ресуспендировали в буфере для лизиса **VI** (в расчете 2 мл

буфера на 1 г клеточной биомассы), содержащем 0,5 мг/мл лизоцима и 2 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), и инкубировали при слабом перемешивании 18 ч при 4°C. Затем проводили первую стадию очистки фермента (Схема III.1, серым цветом выделены фракции, не содержащие целевой белок).

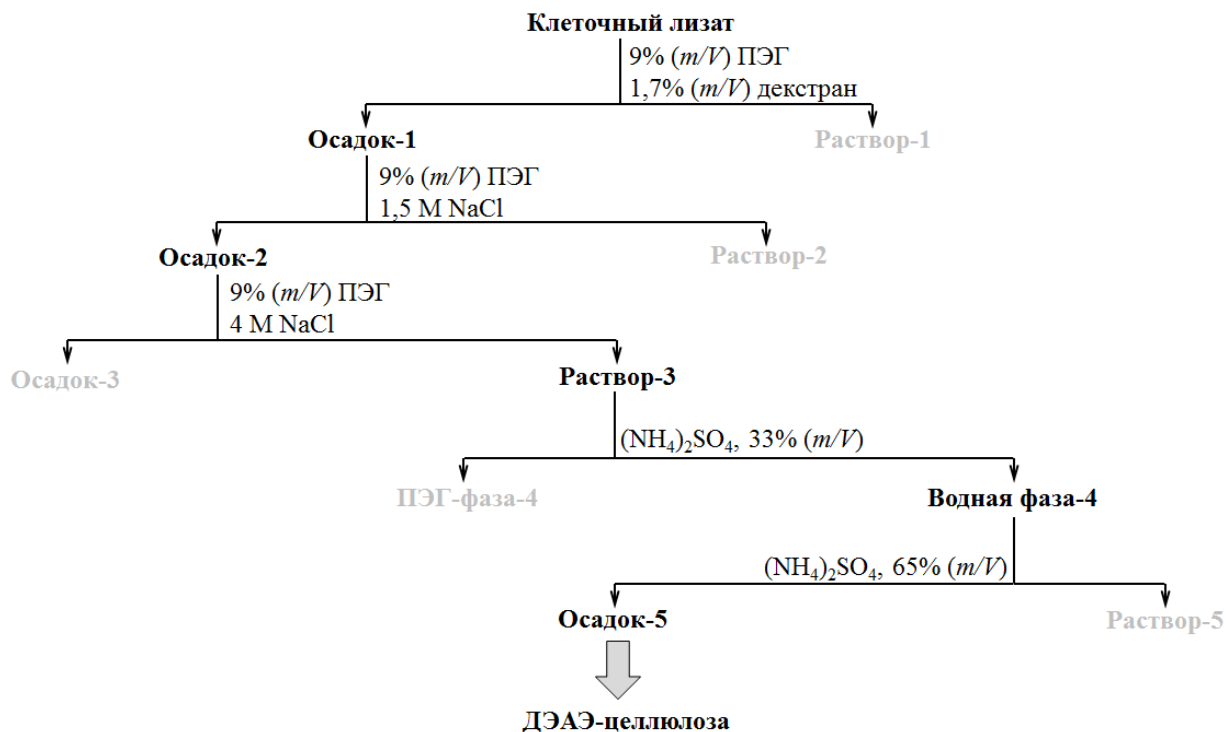


Схема III.1.

К 100 мл клеточной суспензии прибавляли 3,1 мл 30%-ного (*m/V*) раствора ПЭГ-6000 (Sigma, США) и 0,9 мл 20%-ного (*m/V*) раствора декстрана-500 в 0,1 М HEPES (pH 7,0) и инкубировали при слабом перемешивании 20 мин при 4°C. После центрифугирования (30 мин, 12000 об./мин, 4°C) осажденную биомассу (**Осадок-1** на Схеме III.1) ресуспендировали в 2,4-кратном объеме буфера **VI**, добавляли раствор ПЭГ-6000 до концентрации 9% (*m/V*) и кристаллический NaCl (Ф. к. 1,5 М) и инкубировали 25 мин при 4°C при медленном помешивании. После центрифугирования (30 мин, 12000 об./мин, 4°C) и отделения осадка (**Осадок-2** на Схеме III.1) процедуру повторяли, добавляя кристаллический NaCl до концентрации 4 М. После центрифугирования отбирали жидкость над осадком (**Раствор-3** на Схеме III.1) и проводили диализ против буфера **VI** в течение 4 ч при 4°C (после 2 ч производили замену буфера). Концентрацию NaCl в растворе после диализа проверяли методом кондуктометрии. Если концентрация NaCl превышала 0,5 М, раствор разбавляли до нужного объема буфером **VI**. На каждой стадии очистки отбирали аликвоты для анализа белкового состава с помощью гелеэлектрофореза по Лэммли (рис. III.2).

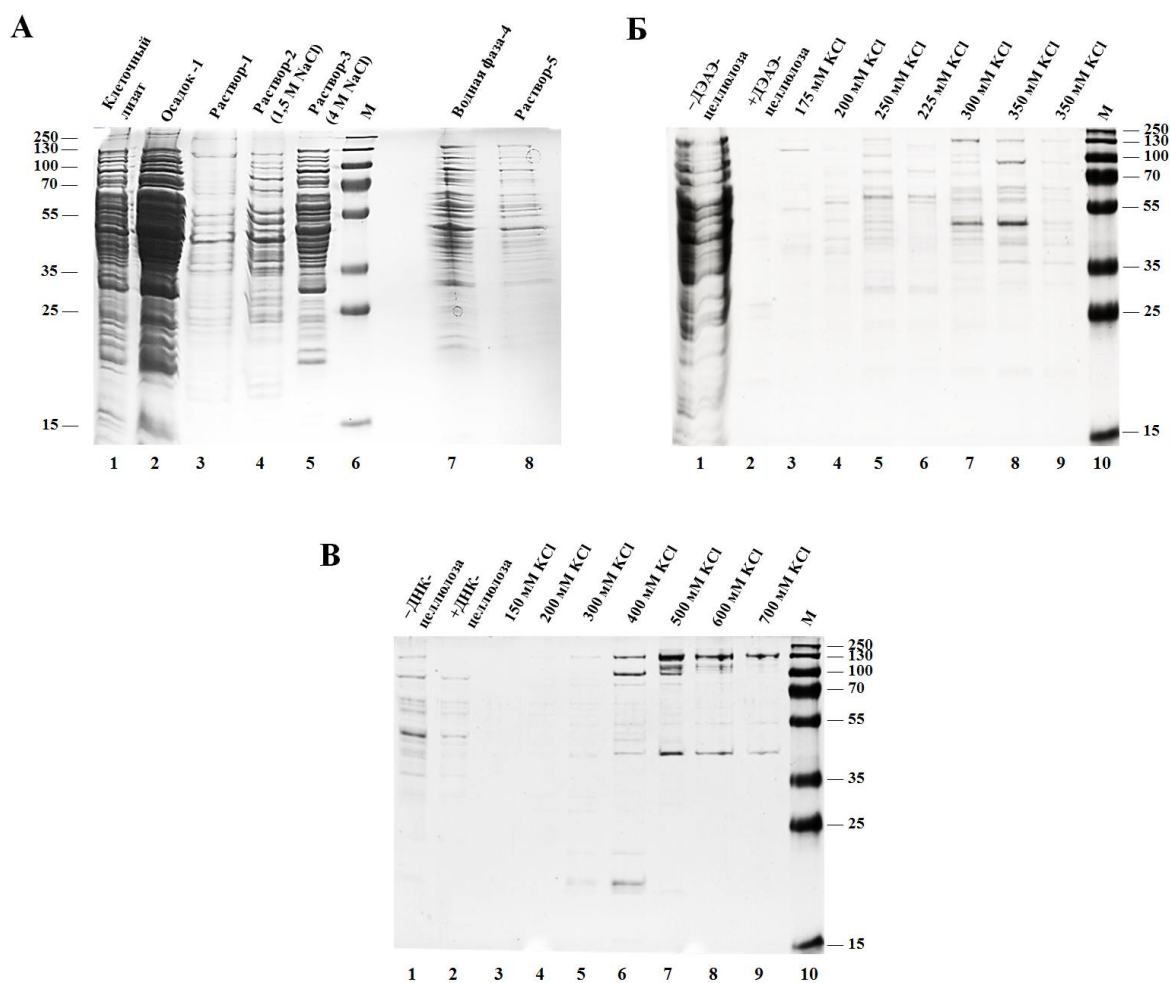


Рис. III.2. Анализ фракций в процессе выделения и очистки холофермента РНКП *B.subtilis* согласно Методике 3. (А) Первая стадия выделения фермента (см. Схему III.1). Дорожка 1 – исходный клеточный лизат, дорожка 2 – растворенный осадок-1 (после осаждения ПЭГ и декстраном), дорожка 3 – раствор-1 (после осаждения ПЭГ и декстраном), дорожка 4 – раствор-2, дорожка 5 – раствор-3, дорожка 7 – водная фаза-4 (33% (*m/V*) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), дорожка 8 – раствор-5 (65% (*m/V*) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). (Б) Вторая стадия выделения РНКП – хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Дорожка 1 – белковая фракция до нанесения на колонку, дорожка 2 – белковая фракция, не сорбируемая на ДЭАЭ-целлюлозе, дорожки 3-9 – фракции, полученные после промывки сорбента аликвотами буфера **ВII** с возрастающей концентрацией KCl (175–350 мМ). (В) Третья стадия выделения РНКП – хроматография на ДНК-целлюлозе. Дорожка 1 – белковая фракция до нанесения на колонку, дорожка 2 – белковая фракция, не сорбируемая на ДНК-целлюлозе, дорожки 3-9 – фракции, полученные после промывки сорбента аликвотами буфера **ВII** с возрастающей концентрацией KCl (150–700 мМ).

На следующей стадии в раствор после диализа добавляли кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до достижения концентрации 33% (*m/V*) и после инкубации в бане со льдом в течение 20 мин центрифугировали (20 мин, 12000 об./мин, 4°C) до расслоения водной фазы и ПЭГ. К отобранной фазе (**Водная фаза-4** на Схеме III.1) добавляли кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до достижения концентрации 65% (*m/V*) и повторяли процедуру. После центрифугирования (20 мин, 12000 об./мин, 4°C) выпавший осадок (**Осадок-5** на Схеме III.1) растворяли в буфере **ВII** и наносили на предварительно уравновешенную буфером **ВII** колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (Sigma, США) в течении 12 ч

при 4°C (в расчете 10 мл объема колонки на 10 г исходной клеточной биомассы). Белок элюировали буфером **ВII** со ступенчатым градиентом концентрации KCl (175–350 мМ). Фракции, содержащие целевой белок (300–350 мМ KCl, рис. III.2Б), объединяли, разбавляли буфером **ВII** до концентрации KCl 125 мМ и наносили на колонку с ДНК-целлюлозой (Sigma, США), предварительно уравновешенную буфером **ВII**, содержащим 125 мМ KCl. Элюцию проводили буфером **ВII** со ступенчатым градиентом концентрации KCl (125–700 мМ). Фракции, содержащие целевой белок (600–700 мМ KCl, рис. III.2В), объединяли и проводили диализ против буфера **ВIII** с последующим концентрированием препарата РНКП в центрифужных концентраторах Amicon Ultra-2 30000 NMWL (Millipore, США).

Конструкция плазмидных ДНК, содержащих гены *bsrA* и *bsrB*. Фрагменты ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности генов *bsrA* и *bsrB* были получены методом ПЦР с использованием праймеров, содержащих участки узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI (5'-d(G↓AATTC)-3' / 3'-CTTAA↑G-5') и HindIII (5'-d(A↓AGCTT)-3' / 3'-d(TTCGA↑A)-5'), а также последовательность T7-промотора (табл. III.3).

Таблица III.3. Праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, содержащих последовательности генов *bsrA* и *bsrB*.

Название*	Праймеры* (олигодезоксирибонуклеотиды)
<i>bsrA_F</i>	5' -CAGGAATTC <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGTCCTGATGTGTAGTTGTACACCTAG-3'
<i>bsrA_R</i>	5' -CAGAAGCTTAAAGTCCCAATAGTGCCGTTG-3'
<i>bsrB_F</i>	5' -CAGGAATTC <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAGCTACTTTGTGCGTATTGTAAATTAAG-3'
<i>bsrB_R</i>	5' -CAGAAGCTTATTTCCGAAAAGGAAATGGCTTTC-3'

* F – «прямой» праймер (от англ. «forward»), R – «обратный» праймер (от англ. «reverse»). Индекс d(дезоксид) при написании последовательностей ДНК опущен.

** Участки узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII подчеркнуты, последовательность T7-промотора выделена жирным курсивом.

В качестве матрицы для синтеза фрагментов ДНК, использовали геномную ДНК *B. subtilis* 168. ПЦР проводили по стандартному протоколу (95°C – 60 с, 54°C – 60 с, 72°C – 40 с, цикл повторяли 25 раз). После очистки продуктов реакции полученные ДНК подвергали ферментативному гидролизу: ~ 5 мкг фрагмента ДНК смешивали в 50 мкл буфера для гидролиза (10 мМ Трис-HCl, pH 8,5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 0,1 мг/мл БСА) с 2 мкл (10 е.а./мкл) каждой из эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Аналогичную реакцию проводили для линейаризации вектора pUC18 (см. табл. III.2). Степень гидролиза ДНК в обоих случаях оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием раствором бромид этидия. После выделения и очистки с

помощью коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Нидерланды) целевых ДНК с «липкими концами» проводили их лигирование: 200 нг линейизованного вектора pUC18 смешивали с 200 нг фрагмента ДНК (содержащего гены *bsrA* или *bsrB*) в 20 мкл буфера для T4 ДНК-лигазы (40 mM Трис-НСl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ, 0,5 mM АТР) с 2 мкл (5 е.а./мкл) T4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. Продукты лигирования трансформировали в компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α.

Выделение плазмидных ДНК pBV_T7_bsrA и pBV_T7_bsrB для T7-транскрипции 6S-1 и 6S-2 РНК проводили с помощью коммерческого набора NucleoBond PC («Macherey-Nagel», Германия). Ночные культуры соответствующих клеточных линий выращивали в 3 мл питательной среды **LB** в присутствии 100 мкг/мл ампициллина при 37°C в течение 16-18 ч при 220 об./мин, а затем переносили в 500 мл свежей среды **LB** (содержащей 100 мкг/мл ампициллина) и выращивали при 37°C, 220 об./мин до A₆₀₀ ~ 3-4 О.Е. Клетки осаждали центрифугированием (15 мин, 4000 об./мин, 4°C). Далее проводили выделение плазмид на колонке NucleoBond AX 2000 (Mega) согласно коммерческому протоколу. На последней стадии выделения ДНК осаждали изопропанолом при комнатной температуре, центрифугировали (13500 об./мин в течение 30 мин при 4°C), аккуратно сливали жидкость, осадок высушивали 1-2 мин на воздухе. Выделенную ДНК немедленно растворяли в 200-300 мкл ddH₂O и измеряли оптическую плотность раствора. Концентрацию ДНК определяли из допущения, что A₂₆₀ = 1 о.е./мл пропорционально 50 мкг/мл плазмидной ДНК. Далее плазмидную ДНК переводили в линейную форму с помощью эндонуклеазы рестрикции Fast Digest HindIII (Thermo Fisher Scientific, США). Гидролиз проводили в течение 2 ч при 37°C в буфере Fast Digest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, США). Объем реакционной смеси составлял 200-500 мкл. Для расщепления 1 мкг ДНК использовали 1 ед. акт. фермента. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Гидролизованную ДНК выделяли из смеси фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением ДНК из полученной водной фазы 2,5 объемами абс. EtOH в присутствии 0,083 M AcONa.

Ферментативный синтез и выделение 6S-1 и 6S-2 РНК. 6S-1 РНК (192 н.о.) и 6S-2 РНК (204 н.о.) *B. subtilis* получали с помощью T7-транскрипции. Реакционная смесь (общий объем 0,5 мл) содержала буфер **E**, 15 mM каждого NTP, 40 мкг линейизованной плазмидной ДНК и 1 ед. акт./мл пирофосфатазы. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 37°C и добавляли 150 мкл 30 mM раствора гуанозина в **TE**-буфере, предварительно нагретого до 75°C (Ф. к. 9 mM). Это позволяло получить транскрипты с 5'-ОН концевой

группой для последующего введения ^{32}P -метки. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл T7 РНКП (~ 40 ед. акт./мкл) и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем добавляли вторую аликвоту T7 РНКП (10 мкл) и реакционную смесь инкубировали еще 2 ч при 37°C. Выделение целевых РНК проводили в 8%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с последующей визуализацией под УФ-светом. К вырезанным фрагментам геля, содержащим 6S РНК, добавляли 1 М АсОНа и инкубировали при 4-8°C в течение 14-18 ч. Затем раствор переносили в чистую пробирку, добавляли 2,5-кратный объем абс. ЕтОН, инкубировали при -20°C 2 ч и центрифугировали 30 мин при 4°C со скоростью 13500 об./мин. Жидкость над осадком декантировал, осадок высушивали 5-10 мин на воздухе. Осажденную РНК растворяли в Milli-Q H₂O и определяли концентрацию раствора спектофотометрически.

РНК РНКазы Р *B. subtilis* длиной 409 н.о. (также полученная с помощью T7-транскрипции) любезно предоставлена проф. Р. Хартманном (Марбургский университет имени Филиппса, Германия).

Выделение геномной ДНК *B. subtilis*. 3 мл ночной культуры клеток *B. subtilis* 168 в среде **LB** центрифугировали 10 мин при 7000 об./мин для осаждения клеток. Образовавшийся осадок после двукратного промывания **TE**-буфером ресуспендировали в 300 мкл **TE**-буфера, добавляли 30 мкл раствора лизоцима (20 мг/мл в **TE**-буфере) и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем добавляли 100 мкл 10%-ного ДСН, 100 мкл 5 М NaClO₄, 500 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1, V/V) и в течение 30 с энергично встряхивали пробирку. Затем центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин, удаляли верхнюю фазу и добавляли 800 мкл охлажденного ЕтОН (-20°C). Образовавшийся осадок ДНК переносили в новую пробирку, промывали 200 мкл 70%-ного ЕтОН, центрифугировали 5 мин при 13000 об./мин, отбирали жидкую фазу и высушивали ДНК не более 1-2 мин на воздухе с последующим растворением в Milli-Q H₂O.

Синтез фрагментов ДНК, содержащих промоторные области генов *B. subtilis*, методом полимеразной цепной реакции. В качестве матрицы для синтеза фрагментов ДНК, содержащих следующие промоторы *B. subtilis*: *rrnB*, *rrnO*, *veg*, *tuf*, *argC*, *appD*, *cspB*, использовали геномную ДНК *B. subtilis* 168. Для синтеза фрагмента ДНК, содержащего промотор гена С2 фага φ29 использовали фаговую ДНК, любезно предоставленную проф. М. Салас (Центр молекулярной биологии имени С. Очоа, Автономный Университет Мадрида, Испания). Реакцию проводили в 50 мкл Таq-буфера (75 мМ Трис-НСl, рН 8,8,

20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% (V/V) Tween-20) в присутствии 2,5 мМ MgCl₂, 0,25 мМ смеси четырех dNTP, 50 мкМ каждого из праймеров (табл. III.4), 1 ед. акт. Taq-полимеразы.

Таблица III.4. Праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, содержащих промоторы модельных генов *B. subtilis*.

Фрагмент ДНК	Направление праймеров*	Праймеры** (олигодезоксирибонуклеотиды)	Температура «отжига», °С
<i>rrnB</i>	F	5'-GACAAGCTTACACACGCTTTAGAAATCATGG-3'	62
	R	5'-GACGTCGACGATCATTTTCGTTACTTCTCAATG-3'	
<i>veg</i>	F	5'-CATAATTTACCGAAACTTGCG G-3'	56
	R	5'-CAGAAGGGTACGTCTCAGC -3'	
<i>rrnO</i>	F	5'-GAAGAGCATGTTGCTACAGTAGC-3'	62
	R	3'-GTGTGACCTGCGTCGTGCAG-5'	
<i>tuf</i>	F	5'-ATCACTACGGAGAAGTGCCG-3'	56
	R	5'-CATGTGATTTGGAACGGTCG-3'	
<i>argC</i>	F	5'-TTGAGCGGAATTCCTCATGAAC-3'	60
	R	5'-CCGCTGGATGAATAAAGTATGC-3'	
<i>appD</i>	F	5'-TGTCCATTCCTGCTGAGACC-3'	58
	R	5'-TCCGTC AACCGCAGGGATC-3'	
<i>cspB</i>	F	5'-GCAAACGTATGATCASCATATCG-3'	56
	R	5'-AAGCCTTCGCCTTGAATAGC-3'	
<i>C2 phi29</i>	F	5'-CTGTGTTTTGTGTTGATGATGTC-3'	58
	R	5'-GGCGCTTTAAAGTAGGGTACAGCGACAAC-3'	

* F – «прямой» праймер (от англ. «forward»), R – «обратный» праймер (от англ. «reverse»)

** Индекс d (дезокси) опущен. Праймеры к фрагментам ДНК *argC*, *C2 phi29* и *cspB* синтезированы компанией Integrated DNA Technologies (США); остальные праймеры синтезированы с.н.с. Романовой Е.А. (НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова).

Реакцию проводили в приборе для амплификации Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf North America, США). В зависимости от температуры «отжига» праймеров использовали различные условия проведения ПЦР. Представленный цикл ПЦР (табл. III.5) повторялся 25 раз.

Таблица III.5. Условия проведения ПЦР. Стандартный цикл.

Стадия	Температура, °С	Время, с
«Плавление» ДНК	94	60
«Отжиг» праймеров	согласно данным в табл. 8	60
Элонгация	72	40

После ПЦР реакционные смеси объединяли, отбирали аликвоты, в которые добавляли 6-кратный раствор для нанесения в гель Orange Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали методом электрофорез в 1%-ном агарозном геле

(содержащем 0,5мкг/мл (*m/V*) бромистого этидия) с последующей визуализацией полос под УФ-светом (рис. III.3). Длину ДНК-продуктов (табл. III.6) оценивали по подвижности в геле соответствующих ДНК-маркеров. Как видно из рис. III.3 ПЦР во всех случаях проходит эффективно без побочных продуктов реакции, а длины полученных ДНК-фрагментов соответствуют рассчитанным. Очистку фрагментов ДНК после ПЦР проводили с помощью коммерческого набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System («Promega», США) по стандартному протоколу.

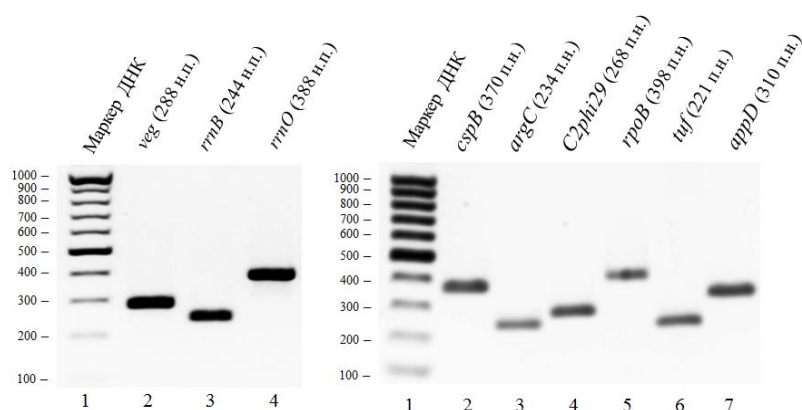


Рис. III.3. Анализ продуктов ПЦР. Фотография под УФ-светом 1%-ного агарозного геля, окрашенного раствором этидия бромидом. Дорожка 1 – ДНК-маркер (длина фрагментов (н.п.) указана слева).

Таблица III.6. Значения длин ПЦР-фрагментов ДНК и предполагаемых РНК-транскриптов для промоторов различных генов, используемых для изучения ингибирования транскрипции.

Ген	Длина
	ДНК, н.п.
<i>argC</i>	234
<i>appD</i>	310
<i>cspB</i>	370
<i>C2φ29</i>	268
<i>tuf</i>	221
<i>rrnO</i>	386
<i>rrnB</i>	244
<i>veg</i>	288

Транскрипция *in vitro*. 1 пмоль очищенных фрагментов ДНК (ф. к. 100 нМ), смешивали с 2 мкл буфера LM и 0,6 мкл холофермента σ^A -РНКП (0,7 мкг/мкл) и инкубировали в объеме 6 мкл 10 мин при 37°C для образования комплекса ДНК:РНКП. Затем добавляли различные количества 6S-1 РНК, 6S-2 РНК или РНК РНКазы Р *B. subtilis* (409 н.о., получена с помощью T7-транскрипции) в объеме 2 мкл и инкубировали еще 10 мин при 37°C для установления равновесия между комплексами РНК:РНКП и ДНК:РНКП. Транскрипцию начинали добавлением 2 мкл смеси из четырех рибонуклеозидтрифосфатов: АТР, СТР, GTP (Ф. к. 50 или 200 мкМ каждого), УТР (Ф. к.

12,5 или 50 мкМ), содержащей 0,5 мкКи [α - 32 P]УТР (4000 Ки/ммоль), и инкубировали 20 мин при 37°C. Конечная концентрация σ^A -РНКП составляла примерно 100 нМ; концентрации 6S-1, 6S-2 или РНК РНКазы Р: 0,2, 0,5, 1, 2 или 5 мкМ. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл двукратного раствора для нанесения в гель RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США). Смесь прогревали 5 мин при 95°C (для денатурации РНКП и разрушения вторичных структур РНК) и немедленно замораживали. Продукты транскрипции анализировали методом электрофореза в 5%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины при напряженности поля 5 В/см в однократном ТВЕ-буфере.

Ренатурация 6S-1 и 6S-2 РНК и формирование комплексов с синтетическими пРНК. Растворы 0,1-5 мкМ 6S-1 или 6S-2 РНК в буфере ТЕ нагревали до 95°C и инкубировали в течение 5 мин (объем реакционной смеси составлял 4-8 мкл), а затем ступенчато охлаждали, инкубируя каждые 5 мин при 80, 70, 60, 50 и 37°C. Для формирования комплексов 6S-1 или 6S-2 РНК с синтетическими пРНК (табл. III.7) процедуру ренатурации проводили в присутствии 2-10-кратных избытков олигорибонуклеотида.

Таблица III.7. Олигорибонуклеотиды – аналоги пРНК, использованные в работе.

Название	Нуклеотидная последовательность	Производитель*
p8 _{6S-1}	5'-GUUCGGUC-3'	IDT
p12 _{6S-1}	5'-GUUCGGUCAAAA-3'	IDT
p13 _{6S-1}	5'-GUUCGGUCAAAAC-3'	IDT
p14 _{6S-1}	5'-GUUCGGUCAAAACU-3'	Noxhon
p20 _{6S-1}	5'-GUUCGGUCAAAACUAGGUGU-3'	МГУ
p12 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAAC-3'	Noxhon
p13 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAACU-3'	МГУ
p14 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAACUU-3'	МГУ
p15 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAACUUA-3'	IDT
p16 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAACUUA-3'	МГУ
p20 _{6S-2}	5'-AAAGGUUAAAACUUAUUCA-3'	МГУ

* IDT: Integrated DNA Technologies, США; Noxhon: Noxhon Pharma GmbH, Германия; МГУ: синтезированы с.н.с. кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Зацепиным Т.С.

Комплексообразование 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП. 6S-1 или 6S-2 РНК (0,1-2 мкМ) после процедуры ренатурации смешивали с 2 мкл 5-кратного буфера LM, содержащего 0,5 мкг/мкл гепарина, и 0,5-2 мкл препарата РНКП (Ф. к. 0,05-3 мкМ), выделенного по Методике 3. Реакционные смеси инкубировали в течение 30 мин при 37°C, добавляли 2 мкл 10%-ного раствора глицерина или 2 мкл 6-кратного раствора для нанесения в гель

DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США) и наносили на 5-, 7,5- или 15%-ный ПААГ (1×TBE). Затем проводили электрофорез в течении 3-8 ч при напряженности поля 5 В/см. Гели низкой процентности (5%- и 7,5%-ные) перед автордиографией высушивали.

Комплексообразование 6S-1 и 6S-2 РНК с РНКП в присутствии смеси нуклеозидтрифосфатов. 6S-1 или 6S-2 РНК (1 мкМ) после процедуры ренатурации смешивали с 2 мкл 5-кратного буфера **LM**, содержащего 0,2 мкг/мкл гепарина, и 1 мкл препарата РНКП (ф. к. 2 мкМ), выделенного по Методике 3. Реакционные смеси инкубировали 30-180 мин при 37°C, а затем добавляли 2 мкл смеси четырех нуклеозидтрифосфатов (1 мМ каждого) и дополнительно инкубировали в течение 1-180 мин. Перед нанесением в 7,5%-ный ПААГ в реакционные смеси добавляли 2 мкл 6-кратного раствора для нанесения в гель DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США).

Комплексообразование РНКП с предварительно сформированными дуплексами между 6S-1/6S-2 РНК и синтетическими пРНК. 6S-1 или 6S-2 РНК (1 мкМ) после процедуры ренатурации в присутствии 2 мкМ или 10 мкМ синтетических олигорибонуклеотидов разной длины смешивали с 2 мкл 5-кратного буфера **LM**, содержащего 0,5 мкг/мкл гепарина, и 1 мкл препарата РНКП (ф. к. 2 мкМ), выделенного по Методике 3. Реакционные смеси инкубировали в течение 30 мин при 37°C, смешивали с 2 мкл 6-кратного раствора для нанесения в гель DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали методом электрофореза в 7,5- или 15%-ном ПААГ (1×TBE).

Транскрипция *de novo* пРНК с матрицы 6S-1 или 6S-2 РНК. 6S-1 или 6S-2 РНК (1-5 мкМ) после процедуры ренатурации в отсутствие или в присутствии синтетических олигорибонуклеотидов разной длины (10 мкМ) смешивали с 2 мкл 5-кратного буфера **LM**, содержащего 0,5 мкг/мкл гепарина, и 1 мкл препарата РНКП (ф. к. 2 мкМ), выделенного по Методике 3. Реакционные смеси инкубировали в течение 30 мин при 37°C, а затем начинали транскрипцию добавлением 2 мкл смеси из четырех нуклеозидтрифосфатов (1 мМ каждого, Ф. к. 200 мкМ, если не указано иное), содержащей 0,5 мкКи [γ -³²P]RTP (где R = A, G) или [α -³²P]NTP (3000 мкКи/ммоль). После инкубации при 37°C в течение 1 ч реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 25%-ном ПААГ. Перед нанесением на гель образцы смешивали с эквивалентным объемом раствора **P1** и инкубировали 5 мин при 95°C (для денатурации РНКП и разрушения комплексов 6S РНК:пРНК) с последующим быстрым охлаждением в бане со льдом.

Синтез фрагментов ДНК, содержащих антисмысловые последовательности генов 6S-1, 6S-2 и 5S РНК *B. subtilis* под контролем T7-промотора. Для синтеза РНК-зондов к 6S-1, 6S-2 и 5S РНК *B. subtilis* необходимо было получить фрагменты ДНК, в которых T7-промотор располагался перед антисенсовой цепью соответствующих генов. Для этого использовали набор праймеров, перечисленный в табл. III.8.

Таблица III.8. Праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, содержащих гены *bsrA*, *bsrB* и измененной направленности.

Название*	Праймеры** (олигодезоксирибонуклеотиды)
bsrA_inv_F	5' -AAGGGAAATAAAGTCCTGATGTGTTAGTTG-3'
bsrA_inv_R	5' - TAATACGACTCACTATAGGG AAAGTCCCAATAGTGCCGTTG-3'
bsrB_inv_F	5' -GAAGCTACTTTGTGCGTATTGTTAATTAAG-3'
bsrB_inv_R	5' - TAATACGACTCACTATAGG TTTTCCGAAAAGGAAATGGCTTT-3'
5S_inv_F	5' -AGAGGTCACACCCGTTCCCAT-3'
5S_inv_R	5' - TAATACGACTCACTATAGG GGGCGGCGTCCTACTCTCA-3'

* F – «прямой» праймер (от англ. «forward»), R – «обратный» праймер (от англ. «reverse»). Индекс d (дезокси) при написании последовательностей ДНК опущен.

** Последовательность T7-промотора выделена жирным курсивом.

В качестве матрицы для синтеза ДНК-фрагментов использовали геномную ДНК *B. subtilis* 168. ПЦР проводили по стандартному протоколу (95°C – 60 с, 54°C – 60 с, 72°C – 40 с, цикл повторяли 25 раз). Реакционные смеси анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (1×TBE) и проводили выделение и очистку целевых ДНК с помощью коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Нидерланды).

Получение DIG-меченных зондов для детекции фрагментов РНК методом блот-гибридации. Детекцию 6S-1, 6S-2 и 5S РНК *B. subtilis* проводили с помощью нерадиоактивной блот-гибридации с использованием дигоксигенин-(DIG)-меченных РНК-зондов, полученных T7-транскрипцией в присутствии DIG-11-UTP (схема III.2) с помощью коммерческого набора Northern Starter Kit (Roche Diagnostics, Швейцария). В качестве матриц для транскрипции использовали ПЦР-фрагменты ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности которых комплементарны 6S-1, 6S-2 или 5S РНК *B. subtilis* (антисмысловые). Согласно коммерческому протоколу (Roche Diagnostics, Швейцария) 1 мкг ПЦР-фрагмента смешивали в объеме 20 мкл с 2 мкл 10-кратного раствора для введения остатка DIG в РНК (10 мМ АТФ, СТР, GTP (каждого), 6,5 мМ UTP, 3,5 мМ DIG-11-UTP), 2 мкл 5-кратного буфера для транскрипции (0,4 М Трис-НСl, рН 8,0, 60 мМ MgCl₂, 100 мМ ДТТ, 20 мМ спермидина) и 2 мкл РНК-полимеразы T7 (20 ед. акт./мкл). После инкубации в течение 2 ч при 37°C в реакционную смесь

добавляли вторую аликвоту РНК-полимеразы T7 (2 мкл) и дополнительно инкубировали 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 200 мМ ЭДТА (рН 8,0), разделяли на две части (~ 10 мкл) и замораживали при -20°C. Полученный раствор РНК-зонда (10 мкл) размораживали непосредственно перед использованием.

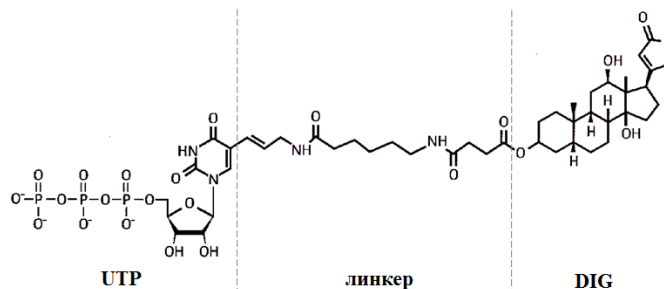


Схема III.2.

Детекцию пРНК проводили с помощью комплементарных пРНК_{6S-1} или пРНК_{6S-2} DIG-меченных олигодезоксинуклеотидов, содержащих остатки ковалентно замкнутых нуклеозидов (LNA). В контрольном эксперименте также использовали 15-звенный 5'-[³²P]-меченный зонд к пРНК_{6S-2} (табл. III.9). Все LNA-содержащие олигонуклеотиды были синтезированы компанией Exiqon (Дания).

Таблица III.9. Олигорибонуклеотиды – зонды к пРНК, использованные в работе.

Название	Нуклеотидная последовательность*
L14 _{6S-1}	5'-DIG-d(<u>AGTTT</u> TG <u>ACCGAAC</u>)-3'
L12 _{6S-2}	5'-DIG-d(<u>GTTT</u> T <u>AA</u> C <u>CTTT</u>)-3'
L15 _{6S-2}	5'-d(TAAG <u>TTT</u> T <u>AA</u> C <u>CTTT</u>)-3'

* N- остаток LNA

Подготовка мембран с фрагментами РНК к гибридизации. Реакционные смеси объемом 10 мкл полученные после транскрипции *in vitro* с матрицы 6S-1 и 6S-2 РНК или водные растворы (10 мкл) общей РНК, выделенной из клеток *B. subtilis* (3 мкг для детекции 5S и 6S РНК, 10 мкг для детекции пРНК) смешивали с 2 мкл 6-кратного буфера для нанесения в гель DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США), инкубировали в течении 5 мин при 95°C с последующим охлаждением во льду и проводили последующее разделение методом электрофореза в 10%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях (для детекции пРНК) или в 7%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевины, для детекции 6S РНК). Имобилизацию фрагментов РНК на положительно заряженную нейлоновую мембрану (Roche Diagnostics, Швейцария) проводили, используя прибор для полусухого переноса (C.B.S. Scientific Company, США) в 0,5-кратном буфере ТВЕ при напряженности поля 3.75 мА/см² в течении 18 ч при комнатной температуре.

Для фиксации длинных фрагментов РНК (для детекции 5S и 6S РНК) мембрану помещали на чистое стекло и инкубировали в течение 1 ч при 80°C.

Для фиксации коротких фрагментов РНК (для детекции пРНК) мембрану переносили на целлюлозную подложку, пропитанную водным раствором **P6** (в расчете ~ 24 мл раствора на мембрану размером 5×10 см), помещали в герметичную емкость и инкубировали в течение 2 ч при 60°C. В результате фрагменты РНК взаимодействовали с аминоклассами на поверхности мембраны.

Иммуноферментный анализ (блот-гибридизация) фрагментов РНК. После иммобилизации фрагментов РНК на мембране её дважды промывали ddH₂O, помещали в пластиковый флакон с завинчивающейся крышкой, добавляли 10 мл раствора для гибридизации, приготовленного из гранул DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Швейцария) и преинкубировали в течение 2 ч при 68°C в гибридизационной печи при постоянном перемешивании. Затем раствор для гибридизации декантировали, и к мембране добавляли свежий подогретый до 68°C гибридизационный раствор, содержащий 30 мкМ DIG-меченного олигорибонуклеотида-зонда к пРНК_{6S-1} или пРНК_{6S-2} или 10 мкл раствора DIG-меченных зондов к 6S-1, 6S-2 и 5S РНК *B. subtilis*. Перед добавлением к раствору для гибридизации аликвоты водных растворов РНК-зондов инкубировали в течение 5 мин при 95°C с последующим охлаждением в бане со льдом для денатурации. Гибридизацию проводили в течение 18 ч при 68°C, после чего мембрану сначала промывали буфером **SW1** (2 раза по 5 мин, 37°C), а затем буфером **SW2** (2 раза по 15 мин, 68°C). Иммунодетекцию проводили, используя коммерческие поликлональные антитела к дигоксигенину Anti-DIG-AP (Roche Diagnostics, Швейцария) согласно инструкциям, указанным в коммерческом протоколе. Выделенные из клеток овцы Fab-фрагменты (DIG-антитела) ковалентно связаны со щелочной фосфатазой. В процессе детекции они дефосфорилируют коммерческий реагент CDP-star (Roche Diagnostics, Швейцария). В результате происходит разгорание люминесценции ($\lambda = 465$ нм). Сигналы хемилюминесценции детектировали с помощью рентгеновской фотопленки Kodak BioMax Light (Sigma Aldrich, США), которую затем сканировали на приборе GS-800 (BioRad, США). Время экспозиции фотопленки на мембране варьировали от 15 с до 2 ч в зависимости от интенсивности сигнала.

Введение флуоресцентной метки (Cy3, Cy5) в белки. Осажденную и замороженную биомассу клеток дважды промывали 10-20 мл буфера **TBS** и ресуспендировали в водном растворе **P7**. Клетки разрушали последовательным замораживанием в жидком азоте/размораживанием в водяной бане (37°C) в течение 5

циклов. Затем добавляли 10 мкл смеси РНКазы А и ДНКазы I (10 ед. акт. каждой, Thermo Fisher Scientific, США), растворенных в 10 мкл буфера для ДНКазы I (10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ CaCl₂, 10 мМ MgCl₂, 50% (V/V) глицерина) и инкубировали в бане со льдом 30 мин. В клеточную суспензию добавляли буфер Ж до объема 100 мкл, инкубировали в бане со льдом 15 мин и центрифугировали 5 мин со скоростью 13500 об./мин. Жидкость над осадком переносили в новые пробирки. Суммарную концентрацию белков в полученных образцах оценивали по методу Бредфорд. Для введения флуоресцентных меток использовали гидроксисукцинимидные эфиры красителей Cy3 или Cy5, реагирующие с остатками Lys белков. Реакционная смесь содержала 400 пмоль реагента в расчете на 50-100 мкг суммарного белка. Смесь инкубировали 30 мин в бане со льдом в темноте. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10 мМ водного раствора лизина. Эффективность введения флуоресцентных меток контролировали при помощи разделения окрашенных образцов белков (~ 2 мкг) в одномерном ДСН-ПААГ, поочередно детектируя флуоресценцию Cy3 и Cy5 с помощью сканера флуоресценции Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager. Для исключения возможности различного влияния Cy3 и Cy5 на подвижность одного и того же белка проводили контрольный эксперимент (рис. III.4).

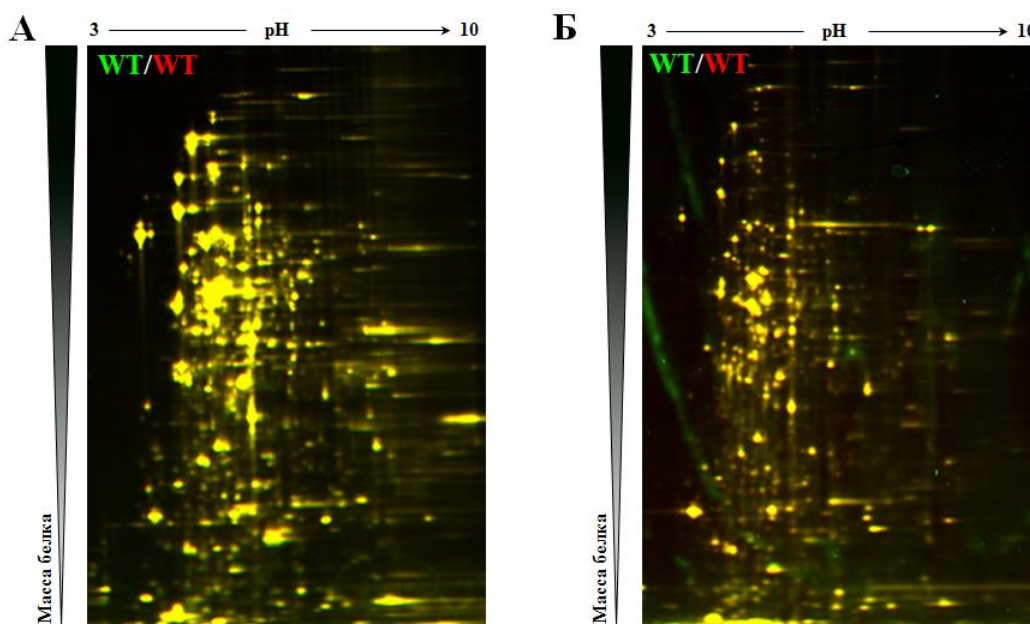


Рис. III.4. Двумерный электрофорез белковых фракций, выделенных из клеток *B. subtilis* дикого типа (PY79) в экспоненциальной (А) и стационарной фазах роста (Б). Контрольный эксперимент: эквимольные количества одного белкового образца метили Cy5 или Cy3 и смешивали.

Эквимольные количества белковой фракции, выделенной из клеток дикого типа, метили Cy3 или Cy5, смешивали и проводили двумерный гель-электрофорез. В этом случае не было замечено появления зон красного или зеленого цвета, которые могли бы свидетельствовать об измененной подвижности белка с одним флуоресцентным красителем по сравнению с этим же белком, меченным другим флуорофором (рис. III.4).

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 *B. subtilis* (РНКП), 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wassarman K.M., Storz G. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. // *Cell*. 2000. V. 101. P. 613-623.
2. Barrandon C., Spiluttini B., Bensaude O. Non-coding RNAs regulating the transcriptional machinery. // *Biol. Cell*. 2008. V. 100. P. 83-95.
3. Wassarman K.M., Saecker R.M. Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. // *Science*. 2006. V. 314. P. 1601-1603.
4. Barrick J.E., Sudarsan N., Weinberg Z., Ruzzo W.L., Breaker R.R. 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. // *RNA*. 2005. V. 11. P. 774-784.
5. Kobayashi K., Ehrlich S.D., Albertini A., Amati G., Andersen K.K., Arnaud M., Asai K., Ashikaga S., Aymerich S., Bessieres P., et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. V. 100. P. 4673-4683.
6. Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. // *Can J Microbiol*. 2004. V. 50. P. 1-17.
7. Kaikkonen M.U., Lam M.T.Y., Glass C.K. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. // *Cardiovascular Res*. 2011. V. 90. P. 430-440.
8. Costa F.F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. // *Gene*. 2005. V. 357. P. 83-94.
9. Yan B.X., Ma J.X. Promoter-associated RNAs and promoter-targeted RNAs. // *Cell Mol Life Sci*. 2012. V. 69. P. 2833-2842.
10. Ørom U.A., Lim M.K., Savage J.E., Jin L., Saleh A.D., Lisanti M.P., Simone N.L. MicroRNA-203 regulates caveolin-1 in breast tissue during caloric restriction. // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. P. 1291-1295.
11. Altuvia S. Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. // *Curr Opin Microbiol*. 2007. V. 10. P. 257-261.
12. Waters L.S., Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. // *Cell*. 2009. V. 136 (4). P. 615-628.
13. Repoila F., Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. // *Biol Cell*. 2009. V. 101. P. 117-131.
14. Gottesman S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. // *Trends Genet*. 2005. V. 21. P. 399-404.
15. Storz G., Vogel J., Wassarman K.M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. // *Mol Cell*. 2011. V. 43. P. 880-891.
16. Karginov F.V., Hannon G.J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. // *Mol Cell*. 2010. V. 37. P. 7-19.
17. Babitzke P., Romeo T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. // *Curr Opin Microbiol*. 2007. V. 10. P. 156-163.
18. Sahr T., Brüggemann H., Jules M., Lomma M., Albert-Weissenberger C., Cazalet C., Buchrieser C. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. // *Mol Microbiol*. 2009. V. 72. P. 741-762.
19. Brantl S. Small non-coding RNA in bacteria. // In: *The chemical biology of nucleic acids*. Ed. Mayer G. Wiley-VCH, Weinheim. 2010. Ch. 9. P. 199-222.

20. Chant E.L., Summers D.K. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. // *Mol Microbiol.* 2007. V. 63. P. 35–43.
21. Brownlee G.G., Sanger F. Nucleotide sequences from the low molecular weight ribosomal RNA of *Escherichia coli*. // *J Mol Biol.* 1967. V. 23. P. 337-353.
22. Brownlee G.G. Sequence of 6S RNA of *E. coli*. // *Nat New Biol.* 1971. V. 229. P. 147-149.
23. Lee S.Y., Bailey S.C., Apirion D. Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA. // *J Bacteriol.* 1978. V. 133. P. 1015-1023.
24. Pene J.J., Knight E., Darnell J.E. Characterization of a new low molecular weight RNA in *HeLa* cell ribosomes. // *J Mol Biol.* 1968. V. 33. P. 609-623.
25. Zwieb C. Is the 6S RNA of prokaryotes an equivalent to the 7SL RNA of eukaryotes? // *Endocyt. C. Res.* 1986. V. 3. P. 41-51.
26. Walter P., Blobel G. Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. // *Cell.* 1983. V. 34. P. 525-533.
27. Hsu L.M., Zagorski J., Wang Z., Fournier M.J. *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. // *J Bacteriol.* 1985. V. 161. P. 1162-1170.
28. Lee C.A., Fournier M.J. Beckwith J. *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. // *J Bacteriol.* 1985. V. 161. P. 1156-1161.
29. Vogel D.W., Hartmann R. K., Struck J.C.R., Ulbrich N., Erdmann V.A. The sequence of the 6S RNA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P.4583-4591.
30. Wassarman K.M., Zhang A., Storz G. Small RNAs in *Escherichia coli*. // *Trends Microbiol.* 1999. V. 7. P. 37- 45.
31. Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. // *Annu Rev Microbiol.* 2000. V. 54. P. 499-518.
32. Gildehaus N., Neusser T., Wurm R., Wagner R. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 1885-1896.
33. Wurm R., Neusser T., Wagner R. 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small *de novo* products. // *Biol. Chem.* 2010. V. 391. P. 187-196.
34. Cavanagh A.T., Klocko A.D., Liu X., Wassarman K.M. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70. // *Mol Microbiol.* 2008. V. 67. P. 1242-1256.
35. Neusser T., Polen T., Geissen R., Wagner R. Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. // *BMC Genomics.* 2010. V. 11. P. 165-179.
36. Artsimovitch I., Patlan V., Sekine S., Vassylyeva M.N., Hosaka T., Ochi K., Yokoyama S., Vassylyev D.G. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. // *Cell.* 2004. V. 117. P. 299-310.
37. Hsu L.M., Zagorski J., Wang Z., Fournier M.J. *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. // *J Bacteriol.* 1985. V. 161. P. 1162-1170.

38. Jeanguenin L., Lara-Núñez A., Pribat A., Mageroy M.H., Gregory J.F. 3rd, Rice K.C., de Crécy-Lagard V., Hanson A.D. Moonlighting glutamate formiminotransferases can functionally replace 5-formyltetrahydrofolate cycloligase. // *J Biol Chem*. 2010. V. 285. P. 41557-41566.
39. Lee J.Y., Park H., Bak G., Kim K.S., Lee Y. Regulation of transcription from two *ssrS* promoters in 6S RNA biogenesis. // *Mol Cells*. 2013. V. 36. P. 227-234.
40. Neusser T., Gildehaus N., Wurm R., Wagner R. Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators important for stress and growth adaptation. // *Biol Chem*. 2008. V. 389. P. 285-297.
41. Kim K.S., Lee Y. Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. // *Nucleic Acids Res*. 2004. V. 32. P. 6057-6068.
42. Brown J.W., Ellis J.C. Comparative Analysis of RNA Secondary Structure: 6S RNA. // In: *Handbook of RNA Biochemistry*. Ed. Hartmann R.K. Wiley-VCH, Weinheim. 2005. Ch. 3. P. 490-512.
43. Steuten B., Wagner R. A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in *Escherichia coli*. // *Biol Chem*. 2012. V. 393. P. 1513-1522.
44. Trotochaud A.E., Wassarman K.M. A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. // *Nat Struct Mol Biol*. 2005. V. 12. P. 313-319.
45. Klocko A.D., Wassarman K.M. 6S RNA binding to Esigma(70) requires a positively charged surface of sigma(70) region 4.2. // *Mol Microbiol*. 2009. V. 73. P. 152-164.
46. Wade J.T., Struhl K. The transition from transcriptional initiation to elongation. // *Curr Opin Genet Dev*. 2008. V. 18. P. 130-136.
47. Steuten B., Setny P., Zacharias M., Wagner R. Mapping the spatial neighborhood of the regulatory 6S RNA bound to *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme. // *J Mol Biol*. 2013. V. 425. P. 3649-3661.
48. Hudson B.P., Quispe J., Lara-Gonzalez S., Kim Y., Berman H.M., Arnold E., Ebright R.H., Lawson C.L. Three-dimensional EM structure of an intact activator-dependent transcription initiation complex. // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2009. V. 106. P. 19830-19835.
49. Weeks K.M., Crothers D.M. Major groove accessibility of RNA. // *Science*. 1993. V. 261. P. 1574-1577.
50. Kondo J., Dock-Bregeon A.C., Willkomm D.K., Hartmann R.K., Westhof E. Structure of an A-form RNA duplex obtained by degradation of 6S RNA in a crystallization droplet. // *Acta Crystallogr*. 2013. V. 69. P. 634-639.
51. Willkomm D.K., Minnerup J., Hüttenhofer A., Hartmann R.K. Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. // *Nucleic Acids Res*. 2005. V. 33. P. 1949-1960.
52. Suzuma S., Asari S., Bunai K., Yoshino K., Ando Y., Kakeshita H., Fujita M., Nakamura K., Yamane K. Identification and characterization of novel small RNAs in the *aspS-yrvM* intergenic region of the *Bacillus subtilis* genome. // *Microbiology*. 2002. V. 148. P. 2591-2598.
53. Ando Y., Asari S., Suzuma S., Yamane K., Nakamura K. Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the *yocI-yocJ* intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. // *FEMS Microbiol Lett*. 2002. V. 207. P. 29-33.

54. Voss B., Hölscher M., Baumgarth B., Kalbfleisch A., Kaya C., Hess W.R., Becker A., Evguenieva-Hackenberg E. Expression of small RNAs in *Rhizobiales* and protection of a small RNA and its degradation products by Hfq in *Sinorhizobium meliloti*. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. V. 390. P. 331-336.
55. Sharma C.M., Hoffmann S., Darfeuille F., Reignier J., Findeiss S., Sittka A., Chabas S., Reiche K., Hackermüller J., Reinhardt R., Stadler P.F., Vogel J. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. // *Nature*. 2010. V. 464. P. 250-255.
56. Mandin P., Repoila F., Vergassola M., Geissmann T., Cossart P. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. // *Nucleic Acids Res*. 2007. V. 35. P. 962-974.
57. Weissenmayer B.A., Prendergast J.G., Lohan A.J., Loftus B.J. Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e17570.
58. Faucher S.P., Friedlander G., Livny J., Margalit H., Shuman H.A. *Legionella pneumophila* 6S RNA optimizes intracellular multiplication. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. V. 107. P. 7533-7538.
59. Rediger A., Geissen R., Steuten B., Heilmann B., Wagner R., Axmann I.M. 6S RNA - an old issue became blue-green. // *Microbiology*. 2012. V. 158. P. 2480-2491.
60. Axmann I.M., Holtzendorff J., Voss B., Kensche P., Hess W.R. Two distinct types of 6S RNA in *Prochlorococcus*. // *Gene*. 2007. V. 406. P. 69-78.
61. Ortega A.D., Gonzalo-Asensio J., García-del Portillo F. Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells. // *RNA Biology*. 2012. V. 9. P.469-488.
62. Bohn C., Rigoulay C., Chabelskaya S., Sharma C.M., Marchais A., Skorski P., Borezée-Durant E., Barbet R., Jacquet E., Jacq A., Gautheret D., Felden B., Vogel J., Bouloc P. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. // *Nucleic Acids Res*. 2010. V. 38. P. 6620-6636.
63. Watanabe T., Sugiura M., Sugita M. A novel small stable RNA, 6Sa RNA, from the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC6301. // *FEBS Lett*. 1997. V. 416. P. 302-306.
64. Cavanagh A.T., Sperger J.M., Wassarman K.M. Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. P. 2234-2246.
65. Kugel J.F., Goodrich J.A. Beating the heat: a translation factor and an RNA mobilize the heat shock transcription factor HSF1. // *Mol Cell*. 2006. V. 22. P. 153-154.
66. Thomas M., Chédin S., Carles C., Riva M., Famulok M., Sentenac A. Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers. // *J Biol Chem*. 1997. V. 272. P. 27980-27986.
67. Kettenberger H., Eisenführ A., Brueckner F., Theis M., Famulok M., Cramer P. Structure of an RNA polymerase II-RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by noncoding RNAs. // *Nat Struct Mol Biol*. 2006. V. 13. P. 44-48.
68. Lehmann E., Brueckner F., Cramer P. Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. // *Nature*. 2007. V. 450. P. 445-449.
69. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Short retroposons in eukaryotic genomes. // *Int Rev*

- Cytol.* 2005. V. 247. P. 165-221.
70. Ponicsan S.L., Kugel J.F., Goodrich J.A. Genomic gems: SINE RNAs regulate mRNA production. // *Curr Opin Genet Dev.* 2010. V. 20. P. 149-155.
 71. Ichianagi K., Li Y., Watanabe T., Ichianagi T., Fukuda K., Kitayama J., Yamamoto Y., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Yabuta Y., Seki Y., Saitou M., Sasaki H. Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. // *Genome Res.* 2011. V. 21. P. 2058-2066.
 72. Vassetzky N.S., Ten O.A., Kramerov D.A. B1 and related SINEs in mammalian genomes. // *Gene.* 2003. V. 319. P. 149-160.
 73. Maraia R.J., Driscoll C.T., Bilyeu T., Hsu K., Darlington G.J. Multiple dispersed loci produce small cytoplasmic Alu RNA. // *Mol Cell Biol.* 1993. V. 13. P. 4233-4241.
 74. Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A., Drullinger L.F., Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. // *Mol Cell.* 2008. V. 29. P. 499-509.
 75. Allen T.A., Von Kaenel S., Goodrich J.A., Kugel J.F. The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. // *Nat Struct Mol Biol.* 2004. V. 11. P. 816-821.
 76. Espinoza C.A., Allen T.A., Hieb A.R., Kugel J.F., Goodrich J.A. B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. // *Nat Struct Mol Biol.* 2004. V. 11. P. 822-829.
 77. Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. TFIIF facilitates dissociation of RNA polymerase II from noncoding RNAs that lack a repression domain. // *Mol Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 91-97.
 78. Fornace A.J.Jr., Alamo I.Jr., Hollander M.C., Lamoreaux E. Induction of heat shock protein transcripts and B2 transcripts by various stresses in Chinese hamster cells. // *Exp Cell Res.* 1989. V. 182. P. 61-74.
 79. Espinoza C.A., Goodrich J.A., Kugel J.F. Characterization of the structure, function, and mechanism of B2 RNA, an ncRNA repressor of RNA polymerase II transcription. // *RNA.* 2007. V. 13. P. 583-596.
 80. Bladon T.S., Frégeau C.J., McBurney M.W. Synthesis and processing of small B2 transcripts in mouse embryonal carcinoma cells. // *Mol Cell Biol.* 1990. V. 10. P. 4058-4067.
 81. Cheung A.C., Cramer P. A movie of RNA polymerase II transcription. // *Cell.* 2012. V. 149. P. 1431-1437.
 82. Yakovchuk P., Goodrich J.A., Kugel J.F. B2 RNA represses TFIIF phosphorylation of RNA polymerase II. // *Transcription.* 2011. V. 2. P. 45-49.
 83. Jones J.C., Phatnani H.P., Haystead T.A., MacDonald J.A., Alam S.M., Greenleaf A.L. 38C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. // *J Biol Chem.* 2004. V. 279. P. 24957-24964.
 84. Wagner S.D., Yakovchuk P., Gilman B., Ponicsan S.L., Drullinger L.F., Kugel J.F., Goodrich J.A. RNA polymerase II acts as an RNA-dependent RNA polymerase to extend and destabilize a non-coding RNA. // *EMBO J.* 2013. V. 32. P. 781-790.
 85. Modahl L.E., Macnaughton T.B., Zhu N., Johnson D.L., Lai M.M. RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. // *Mol Cell Biol.* 2000. V. 16. P. 6030-6039.

86. Zieve G., Penman S. Small RNA species of the *HeLa* cell: metabolism and subcellular localization. // *Cell*. 1976. V. 8. P. 19-31.
87. Nguyen V.T., Kiss T., Michels A.A., Bensaude O. 7SK snRNA binds to and inhibits the activity of Cdk9/cyclin T complexes. // *Nature*. 2001. V. 414. P. 322-325.
88. Yang Z., Zhu Q., Luo K., Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. // *Nature*. 2001. V. 414. P. 317-322.
89. Zhou Q., Yik J.H. The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006. V. 70. P. 646-659.
90. Peterlin B.M., Price D.H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. // *Mol Cell*. 2006. V. 23. P. 297-305.
91. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. С. 1427-1448.
92. Wassarman D.A., Steitz J.A. Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. // *Mol Cell Biol*. 1991. V. 11. P. 3432-3445.
93. Gurney T., Eliceiri G.L. Intracellular distribution of low molecular weight RNA species in *HeLa* cells. // *J Cell Biol*. 1980. V. 87. P. 398-403.
94. Maraia R.J., Bayfield, M.A. The La protein-RNA complex. // *Mol Cell*. 2006. V. 21. P. 149-152.
95. Peterlin B.M., Brogie J.E., Price D.H. 7SK snRNA: a noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012. V. 3. P. 92-103.
96. Gupta S., Busch R.K., Singh R., Reddy R. Characterization of U6 small nuclear RNA cap-specific antibodies. Identification of γ -monomethyl-GTP cap structure in 7SK and several other human small RNAs. // *J Biol Chem*. 1990. V. 265. P. 19137-19142.
97. Kusahara M., Nagasaki K., Kimura K., Maass N., Manabe T., Ishikawa S., Aikawa M., Miyazaki K., Yamaguchi K. Cloning of hexamethylene-bis-acetamide-inducible transcript, HEXIM1, in human vascular smooth muscle cells. // *Biomed. Res*. 1999. V. 20. P. 273-279.
98. Markert A., Grimm M., Martinez J., Wiesner J., Meyerhans A., Meyuhas O., Sickmann A., Fischer U. The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. // *EMBO Rep*. 2008. V. 9. P. 569-575.
99. Ji X., Zhou Y., Pandit S., Huang J., Li H., Lin C.Y., Xiao R., Burge C.B., Fu X.D. SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. // *Cell*. 2013. V. 153. P. 855-868.
100. Barrandon C., Bonnet F., Nguyen V.T., Labas V., Bensaude O. The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes. // *Mol Cell Biol*. 2007. V. 27. P. 6996-7006.
101. Gatignol A. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. // *Adv Pharmacol*. 2007. V. 55. P. 137-159.
102. Karn J., Stoltzfus M.C. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. V. 2. P. a006916.

103. Zhou M., Halanski M.A., Radonovich M.F., Kashanchi F., Peng J., Price D.H., Brady J.N. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. // *Mol Cell Biol.* 2000. V. 20. P. 5077-5086.
104. Sedore S.C., Byers S.A., Biglione S., Price J.P., Maury W.J., Price D.H. Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4347-4358.
105. Krueger B.J., Varzavand K., Cooper J.J., Price D.H. The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e12335.
106. Ott M., Geyer M., Zhou Q. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. // *Cell Host Microbe.* 2011. V. 10. P. 426-435.
107. Lanz R.B., McKenna N.J., Onate S.A., Albrecht U., Wong J., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. // *Cell.* 1999. V. 97. P. 17-27.
108. Caretti G., Lei E.P., Sartorelli V. The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. // *Cell Cycle.* 2007. V. 6. P. 1172-1176.
109. Kugel J.F., Goodrich J.A. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. // *Trends Biochem Sci.* 2012. V. 37. P. 144-151.
110. Kurisu T., Tanaka T., Ishii J., Matsumura K., Sugimura K., Nakatani T., Kawashima H. Expression and function of human steroid receptor RNA activator in prostate cancer cells: role of endogenous hSRA protein in androgen receptor-mediated transcription. // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006. V. 9. P. 173-178.
111. Colley S.M., Leedman P.J. Steroid receptor RNA activator - a nuclear receptor coregulator with multiple partners: insights and challenges. // *Biochimie.* 2011. V. 93. P. 1966-1972.
112. Caretti G., Schiltz R.L., Dilworth F.J., Di Padova M., Zhao P., Ogryzko V., Fuller-Pace F.V., Hoffman E.P., Tapscott S.J., Sartorelli V. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. // *Dev Cell.* 2006. V. 11. P. 547-560.
113. Leygue E. Steroid receptor RNA activator (SRA1): unusual bifaceted gene products with suspected relevance to breast cancer. // *Nucl Recept Signal.* 2007. V. 5. P. e006.
114. Lanz R.B., Razani B., Goldberg A.D., O'Malley B.W. Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA). // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. V. 99. P. 16081-16086.
115. Zhao X., Patton J.R., Ghosh S.K., Fischel-Ghodsian N., Shen L., Spanjaard R.A. Pus3p- and Pus1p-dependent pseudouridylation of steroid receptor RNA activator controls a functional switch that regulates nuclear receptor signaling. // *Mol Endocrinol.* 2007. V. 21. P. 686-699.
116. Ulveling D., Francastel C., Hubé F. When one is better than two: RNA with dual functions. // *Biochimie.* 2011. V. 93. P. 633-644.
117. Krummel D.A., Nagai K., Oubridge C. Structure of spliceosomal ribonucleoproteins. // *F1000 Biol Rep.* 2010. V. 2. P. 39.
118. Lacadie S.A., Rosbash M. Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role

- of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast. // *Mol Cell*. 2005. V. 19. P. 65-75.
119. Dhanasekaran K., Kumari S., Kanduri C. Noncoding RNAs in chromatin organization and transcription regulation: an epigenetic view // *Subcell Biochem*. 2013. V. 61. P.343-372.
 120. Kwek K.Y., Murphy S., Furger A., Thomas B., O’Gorman W., Kimura H., Proudfoot N.J., Akoulitchev A. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. // *Nat Struct Biol*. 2002. V. 9. P. 800-805.
 121. Blume S.W., Meng Z., Shrestha K., Snyder R.C., Emanuel P.D. The 5'-untranslated RNA of the human dhfr minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter. // *J Cell Biochem*. 2003. V. 88. P. 165-180.
 122. Martianov I., Ramadass A., Serra Barros A., Chow N., Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 666-670.
 123. Schneider C., King R.M., Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. // *Cell*. 1988. V. 54. P. 787-793.
 124. Tani H., Torimura M., Akimitsu N. The RNA degradation pathway regulates the function of GAS5 a non-coding RNA in mammalian cells. // *PLoS ONE*. V. 8. P. e55684.
 125. Huarte M., Rinn J.L. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? // *Hum Mol Genet*. 2010. V. 19. P. R152-R161.
 126. Kino T., Hurt D.E., Ichijo T., Nader N., Chrousos G.P. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. // *Sci Signal*. 2010. V. 3. P. ra8.
 127. Smith C.M., Steitz J.A. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. // *Mol Cell Biol*. 1998. V. 18. P. 6897-6909.
 128. Kugel J.F., Goodrich J.A. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. // *Trends Biochem Sci*. 2012. V.;37. P. 144-151.
 129. Weston B.F., Kuzmine I., Martin C.T. Positioning of the start site in the initiation of transcription by bacteriophage T7 RNA polymerase. // *J Mol Biol*. 1997. V. 272. P. 21-30.
 130. Yura T., Ishihama A. Genetics of bacterial RNA polymerases. // *Annu Rev Genet*. 1979. V. 13. P. 59-97.
 131. Yang X., Lewis P.J., Overproduction and purification of recombinant *Bacillus subtilis* RNA polymerase. // *Protein Expr Purif*. 2008. V. 59. P. 86-93.
 132. Anthony L.C., Artsimovitch I., Svetlov V., Landick R., Burgess R.R. Rapid purification of His(6)-tagged *Bacillus subtilis* core RNA polymerase. // *Protein Expr Purif*. 2000. V. 19. P. 350-354.
 133. Mathew R., Chatterji D. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. // *Trends Microbiol*. 2006. V.14. P. 450-455.
 134. Doherty G.P., Fogg M.J., Wilkinson A.J., Lewis P.J. Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. // *Microbiology*. 2010. V. 156. P. 3532-3543.
 135. Burton Z., Burgess R.R., Lin J., Moore D., Holder S., Gross C.A. The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12. // *Nucleic Acids Res*. 1981. V 9. P. 2889-2903.

136. Qi Y., Hulett F.M. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription *in vitro*. // *Mol Microbiol*. 1998. V. 28. P. 1187-1197.
137. Helmann J.D. Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase and associated factors. // *Methods Enzymol*. 2003. V. 370. P. 10-24.
138. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. // М.: Фаур-пресс. 1998. 720 с.
139. Jarmer H., Larsen T.S., Krogh A., Saxild H.H., Brunak S., Knudsen S. Sigma A recognition sites in the *Bacillus subtilis* genome. // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 2417-2424.
140. Krásný L., Tiserová H., Jonák J., Rejman D., Sanderová H. The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. // *Mol Microbiol*. 2008. V. 69. P. 42-54.
141. Reich C., Gardiner K.J., Olsen G.J., Pace B., Marsh T.L., Pace N.R. The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P. Sequence, activity, and partial secondary structure. // *J Biol Chem*. 1986. V. 261. P. 7888-7893.
142. Sierro N., Makita Y., de Hoon M., Nakai K. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36. D93-96.
143. Jarmer H., Larsen T.S., Krogh A., Saxild H.H., Brunak S., Knudsen S. Sigma A recognition sites in the *Bacillus subtilis* genome. // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 2417-2424.
144. Erie D.A., Hajiseyedjavadi O., Young M.C., von Hippel P.H. Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. // *Science*. 1993. V. 262. P. 867-873.
145. Beckmann B.M., Grünweller A., Weber M.H., Hartmann R.K. Northern blot detection of endogenous small RNAs (approximately 14 nt) in bacterial total RNA extracts. // *Nucleic Acids Res*. 2010. V. 38. P. e147.
146. Beckmann B.M., Hoch P.G., Marz M., Willkomm D.K., Salas M., Hartmann R.K. A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 1727-1738.
147. Panchapakesan S.S., Unrau P.J. *E. coli* 6S RNA release from RNA polymerase requires sigma70 ejection by scrunching and is orchestrated by a conserved RNA hairpin. // *RNA*. 2013. V. 18. P. 2251-2259.
148. Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., Hofacker I.L. The Vienna RNA websuite. // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36. P. W70-W74.
149. Meyer F.M., Jules M., Mehne F.M., Le Coq D., Landmann J.J., Görke B., Aymerich S., Stülke J. Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. // *J Bacteriol*. 2011. V.193. P. 6939-6949.
150. Ratnayake-Lecamwasam M., Serror P., Wong K.W., Sonenshein A.L. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. // *Genes Dev*. 2001. V.15. P. 1093-1103.
151. Lopez J.M., Marks C.L., Freese E. The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus subtilis*. // *Biochim Biophys Acta*. 1979. V. 587. P. 238-252.

152. Zeigler D.R., Prágai Z., Rodriguez S., Chevreux B., Muffler A., Albert T., Bai R., Wyss M., Perkins J.B. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. // *J Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 6983-6995.
153. Youngman P., Perkins J., Losick R. Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposonborne *erm* gene. // *Plasmid.* 1984. V. 12. P. 1-9.
154. 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. P. 839-849.
155. Mattatal N.R., Sanderson K.E. *Salmonella typhimurium* LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 2272–2278.