

*На правах рукописи*

Склярова Светлана Анатольевна

**Структурная организация и механизмы действия ФМН-зависимых  
рибопереключателей у бактерий**

Специальность 03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2014

Работа выполнена в лаборатории биохимической генетики Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИГенетика»)

**Научные руководители:**

доктор биологических наук,  
профессор ФГУП «ГосНИИГенетика»

**Миронов Александр Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
Институт молекулярной генетики РАН

**Хмель Инесса Александровна**

кандидат биологических наук  
Научно-исследовательский институт  
Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ)

**Закатаева Наталия Павловна**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 года в \_\_\_\_\_ на заседании  
Диссертационного Совета Д.217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-  
исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по  
адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «Государственный научно-  
исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета,  
кандидат химических наук



Т. Л. Воюшина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Одним из важнейших условий для жизнедеятельности микроорганизмов в меняющихся условиях окружающей среды является способность точного и своевременного контроля экспрессии их генов для обеспечения нормального роста и развития. Традиционно считалось, что функцию генетических регуляторов в клетке могут выполнять исключительно соединения белковой природы. Однако, в последнее время, появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что молекулы РНК обладают широким спектром регуляторных функций в контроле клеточного метаболизма у бактерий. За последнее десятилетие наши представления о регуляторных функциях РНК в клетке значительно расширились благодаря открытию так называемых сенсорных РНК или рибопереключателей. Такие рибопереключатели располагаются в 5'-лидерных областях мРНК генов, экспрессию которых они модулируют. Важным свойством рибопереключателей является их способность напрямую, без помощи белковых посредников, распознавать и связывать определенные клеточные метаболиты. В результате специфического связывания с метаболитом происходит такое изменение конформации лидерной мРНК, которое приводит к выключению или, реже, включению экспрессии прилегающих генов. Многочисленные исследования структуры и механизмов действия сенсорных РНК показали, что регуляция экспрессии генов с участием рибопереключателей широко распространена в мире бактерий, архей, растений, грибов и водорослей. Так, было показано, что рибопереключатели играют ключевую роль в регуляции ряда оперонов *V.subtilis* и *E.coli*, контролирующих биосинтез витаминов, аминокислот, нуклеотидов, ионов металлов и других жизненно важных соединений. Некоторые рибопереключатели осуществляют генетический контроль вирулентности у патогенных видов, поэтому рациональный дизайн соответствующих лигандов представляет перспективную стратегию поиска антимикробных соединений для терапевтического применения. Кроме того, изучение структурно-функциональной организации природных рибопереключателей может способствовать разработке синтетических рибопереключателей для направленной реконструкции метаболизма бактерий, например, с целью утилизации нежелательных гербицидов.

Таким образом, изучение представителей различных классов рибопереключателей имеет важное фундаментальное значение, поскольку расширяет представление о возможных механизмах регуляции экспрессии

генов у бактерий, а также имеет разнообразные практические перспективы в самых различных сферах биотехнологии и медицины.

### **Цель и задачи исследования.**

Целью настоящей работы являлось изучение структурной организации и механизмов действия представителей класса ФМН-зависимых рибопереключателей на моделях *rib*-оперона *B.subtilis*, гена *upaA* *B.subtilis*, а также гена *ribB* *E.coli*.

В процессе работы решались следующие задачи:

1. Установление структуры и особенностей функциональной активности внутренних промоторов *rib*-оперона *B.subtilis*, а также сопоставление основного промотора с внутренними промоторами с точки зрения их значимости для регуляции генов биосинтеза рибофлавина.
2. Проведение детального анализа структурно-функциональной организации лидерной области гена *upaA* *B.subtilis* и выявление регуляторных элементов, участвующих в контроле экспрессии этого гена.
3. Изучение роли Rho-фактора в ФМН-зависимой регуляции лидерной мРНК гена *ribB* *E.coli*.

### **Научная новизна и практическая значимость.**

С помощью экспериментов по достройке праймера были определены старты транскрипции внутренних промоторов *rib*-оперона *B.subtilis*. С использованием метода RT-qPCR показано, что в отличие от основного промотора, расположенного перед первым геном *rib*-оперона, транскрипционные активности внутренних промоторов не зависят от внутриклеточного содержания ФМН.

На модели гена *upaA* *B.subtilis* выявлен комбинативный механизм действия рибопереключателей, который осуществляется как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Результаты экспериментов по транскрипции *in vitro* показали, что связывание лидерной мРНК этого гена с ФМН приводит к преждевременной терминации транскрипции путем формирования структуры *Rho*-независимого терминатора, локализованного в области 210-240 нуклеотидов. С другой стороны, методом тоупринт анализа, было продемонстрировано, что в присутствии ФМН рибосома не может связаться с лидерной мРНК вследствие формирования шпильки секвестра, блокирующего сайт связывания рибосомы (SD-последовательность). Кроме того, результаты сравнительного анализа продуктов гидролиза мРНК в присутствии ФМН и его отсутствии, показали, что в последнем случае в формировании альтернативных структур (антитерминатора и антисеквестра) принимает участие одна и та же область лидерной мРНК. На основании

полученных данных предложена динамическая модель ФМН-зависимого фолдинга лидерной мРНК гена *uraA*.

На модели гена *ribB E.coli* выявлен новый механизм регуляции с участием рибопереключателей, основанный на Rho-зависимой терминации транскрипции. Установлено, что изменение конфигурации рибопереключатателя в результате связывания с ФМН приводит к подавлению дальнейшей транскрипции структурной части гена *ribB E.coli* в результате Rho-зависимой терминации.

Результаты диссертационного исследования расширяют представление о возможных механизмах действия рибопереключателей у бактерий. Подходы и методы, используемые в настоящей работе, могут быть полезны для обнаружения механизмов контроля экспрессии других генов с участием сенсорных РНК. Полученные в работе результаты могут быть использованы в дальнейшем в прикладных целях, в частности, для увеличения активности имеющихся штаммов-продуцентов рибофлавина на основе *B.subtilis*.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Главный вклад в контроль экспрессии генов биосинтеза рибофлавина у *B. subtilis* вносит расположенный перед первым структурным геном *rib*-оперона промотор P1, регуляция которого осуществляется ФМН-зависимым рибопереключателем на уровне терминации транскрипции. Активность внутренних промоторов *rib*-оперона P2 и P3 не регулируется флавинами.

2. Регуляция гена *uraA B.subtilis*, кодирующего транспортер рибофлавина, осуществляется с участием ФМН-зависимого рибопереключатателя как на уровне терминации транскрипции в результате формирования Rho-независимого терминатора, так и на уровне инициации транскрипции путем формирования шпилечной структуры секвестра, блокирующего сайт связывания рибосомы.

3. ФМН-зависимый рибопереключататель, расположенный в лидерной мРНК гена *ribB E.coli*, контролирует Rho-зависимую терминацию транскрипции этого гена.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология Наука XXI века» (г.Пущино, 16-21 апреля 2012 года), выступление на конференции было отмечено как «лучший устный доклад»; на 38-ом Международном Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО) «Биологические механизмы» (г. Санкт-Петербург, 6 - 11 июля 2013 года). Диссертационная работа была апробирована на совместном семинаре секций «Молекулярная биология» и «Генетика микроорганизмов» Ученого Совета ФГУП «ГосНИИгенетика» 28 ноября 2013 года.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них три в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК.

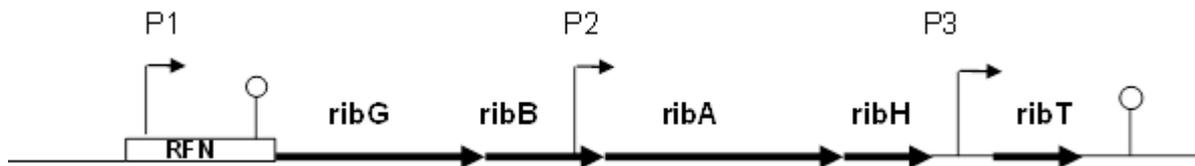
## Структура работы

Диссертация изложена на 132 листах машинописного текста, включая 35 рисунков и 6 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы (159 наименований).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Изучение структурно-функциональной организации внутренних промоторов рибофлавинового оперона *B. subtilis*.

Рибофлавиновый оперон *B. subtilis* (*rib*-оперон) состоит из 5 неперекрывающихся генов, и имеет три регуляторных элемента – регуляторная зона *ribO*, в состав которой входит основной промотор P1, расположенная перед первым структурным геном оперона, а также два дополнительных внутренних промотора P2 и P3, первый из которых расположен в дистальной области гена рибофлавинсинтазы *ribB*, а второй - в интергеноте длиной 113 пар нуклеотидов, отделяющей ген *ribT* от гена люмазинсинтазы *ribH* (рис. 1).



**Рисунок 1. Структура рибофлавинового оперона.** Жирными стрелками на рисунке показано взаимное расположение и направление транскрипции пяти генов *rib*-оперона – *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH* и *ribT*. Тонкими стрелками обозначено направление транскрипции с промоторов P1, P2 и P3 в *rib*-опероне. Шпильчатые структуры показывают локализацию Rho-независимых терминаторов транскрипции.

С основного промотора *rib*-оперона P1 осуществляется транскрипция всех генов *rib*-оперона в виде одной полицистронной мРНК. Регуляция транскрипции, в случае промотора P1, осуществляется с помощью ФМН-зависимого рибопереклювателя. В результате непосредственного взаимодействия флавинов (как правило, ФМН) с лидерной мРНК изменяется ее пространственная структура таким образом, что образуется шпилька Rho-независимого терминатора, которая прерывает дальнейшую транскрипцию всей структурной части (Mironov, et al. 2002). Ключевую роль в этом процессе играет целостность консервативного участка лидерного транскрипта – так

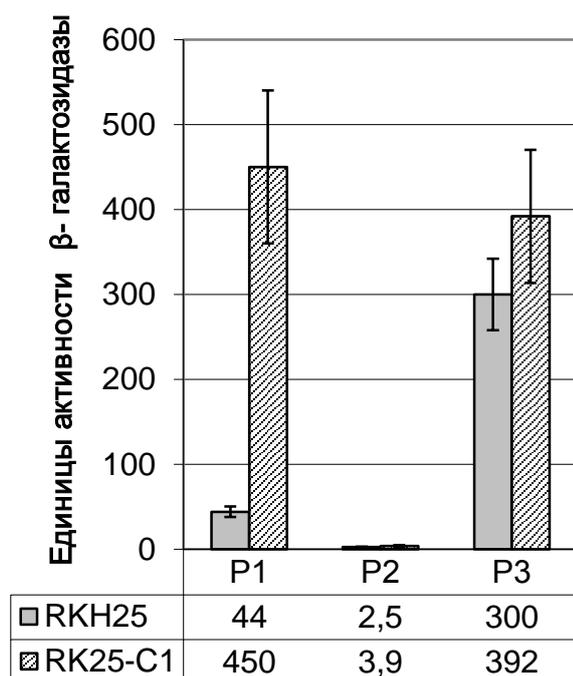
называемого *rfn*-элемента, формирующего структуру домена связывания флавинов (Gelfand, et al. 1999; Kil, et al. 1992).

Данный раздел посвящен определению структуры внутренних промоторов *rib*-оперона, а также установлению особенностей их функциональной активности.

### 1.1. Оценка силы промоторов *rib*-оперона.

Чтобы выяснить вклад внутренних промоторов P2 и P3 в уровень транскрипции соответствующих генов, а также установить, оказывают ли регуляторное влияние флавины на транскрипцию, осуществляемую с этих промоторов были сконструированы транскрипционные фьюзы *ribP<sub>1-3</sub>-LacZ*. С этой целью соответствующие промоторные области P1, P2 и P3 были клонированы в составе экспрессионного интегративного вектора pDG 268, содержащего репортерный ген *lacZ*, а затем интегрированы в амилазный локус хромосомы штамма *B. subtilis* RKH25 и его изогенного варианта RK25-C1, содержащего мутацию в гене *ribC*, которая нарушает синтез эндогенного ФМН. У полученных штаммов изучался уровень транскрипции с каждого промотора путем определения активности  $\beta$ -галактозидазы (рис. 2).

На основании сравнения уровней экспрессии  $\beta$ -галактозидазы у транскрипционных фьюзов *ribP<sub>1-3</sub>-lacZ* в клетках штамма дикого типа RKH25 можно заключить, что транскрипционная активность промотора P2 в десятки раз меньше активности основного промотора *rib*-оперона P1, тогда как промотор P3, напротив, превосходит по эффективности транскрипции основной промотор P1 примерно в 5 раз.



**Рисунок 2. Оценка силы промоторов P1, P2 и P3 *rib*-оперона.** Высота столбцов соответствует уровню  $\beta$ -галактозидазной активности, выраженной в единицах Миллера, для транскрипционных фьюзов *ribP<sub>1-3</sub>-lacZ*, интегрированных в амилазный локус хромосомы штаммов-реципиентов дикого типа RKH25 и его изогенного варианта RK25-C1, содержащего мутацию в гене *ribC*, которая нарушает синтез эндогенного ФМН.

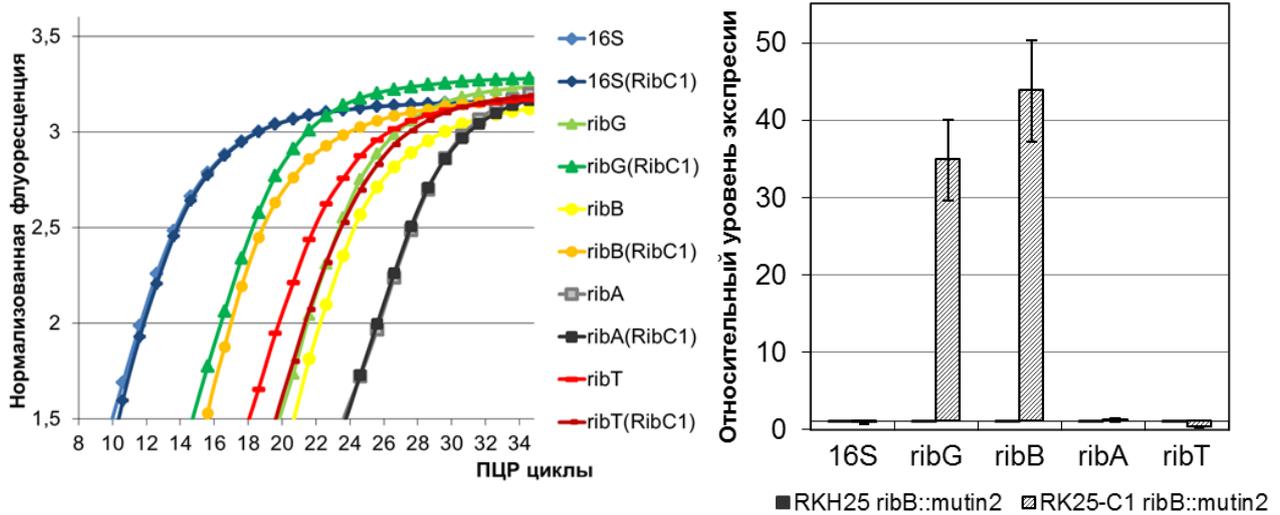
Сравнение уровня активности  $\beta$ -галактозидазы под контролем промоторов P1, P2 и P3 в клетках штаммов RKN25 и RK25-C1 позволяет оценить влияние флавинов на экспрессию каждого промотора. Из данных, представленных на рис. 2 видно, что на фоне мутации *ribC1* существенно увеличивается только активность промотора P1 (в 10 раз), что объясняется действием ФМН-зависимого рибопереключателея. Активность промотора P3 у обоих штаммов находится примерно на одном уровне, а в отношении P2 однозначный вывод сделать нельзя, из-за слишком низких значений активности.

### **1.2. Изучение уровня транскрипции генов *rib*-оперона с помощью RT-qPCR**

Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли P2 и P3 промоторы флавин-регулируемыми, был использован метод RT-qPCR, который позволяет более точно определить относительное изменение количества транскрипта по соответствующей кДНК. Для проведения RT-qPCR были синтезированы четыре пары праймеров, комплементарные соответственно *ribG*, *ribB*, *ribA* и *ribT* генам в составе *rib*-оперона. В качестве количественного контроля суммарной РНК в реакциях обратной транскрипции использовали пару праймеров комплементарных участку гена, кодирующего 16S РНК.

Для этого эксперимента была использована суммарная РНК, выделенная из пары изогенных штаммов (SS131 *ribC*<sup>+</sup> и SSC133 *ribC1*), содержащих инсерцию *ribB::Mutin2*. В этих штаммах происходит преждевременная терминации транскрипции с основного промотора P1 на *Rho*-независимом терминаторе, расположенном внутри интегрированной в ген *ribB* плазмиды рMutin2. Следовательно, транскрипция *ribG* и *ribB* генов должна происходить с промотора P1, а транскрипция гена *ribA* может осуществляться только с собственного промотора P2, а гена *ribT* как с P2, так и с P3 промоторов. Таким образом, сравнение уровня транскрипции генов *ribA* и *ribT* в штаммах SS131 *ribC*<sup>+</sup> и SSC133 *ribC1* позволяет оценить наличие или отсутствие флавин-зависимой регуляции внутренних промоторов P2 и P3.

Результаты эксперимента представлены на рис. 3. На фоне мутации *ribC1* в клетках штамма SSC133 по сравнению с клетками штамма SS131, которые этой мутации не содержат, наблюдался высокий уровень транскрипции только двух генов – *ribG* (в 35 раз) и *ribB* (в 45 раз). Что касается генов *ribA* и *ribT*, то под действием мутации *ribC1* относительный уровень экспрессии этих генов не изменялся. Таким образом, на основании данных, полученных методом RT-qPCR можно сделать заключение о том, что внутренние промоторы P2 и P3 *rib*-оперона не регулируются флавинами.



**Рисунок 3. Оценка влияния флавинов на промоторы *rib*-оперона с помощью RT-qPCR. (А) График накопления флуоресцентного сигнала в логарифмических координатах в зависимости от ПЦР цикла. (Б). Относительный уровень экспрессии генов *rib*-оперона для пары изогенных штаммов, содержащих инсерцию *ribB::Mutin2* (SS131 *ribC*<sup>+</sup> и SSC133 *ribC1*).**

В итоге проведенной работы была установлена структура внутренних промоторов P2 и P3 *rib*-оперона *B.subtilis* (данные не приведены), определена транскрипционная активность этих промоторов и представлены доказательства, что активность обоих промоторов P2 и P3 не подвержена регуляции с участием флавинов. Полученные результаты указывают на то, что основной вклад в регуляцию генов биосинтеза рибофлавина у *B.subtilis* вносит основной промотор *rib*-оперона, подверженный негативной регуляции с участием ФМН-зависимого рибопереключателя.

## 2. Исследование регуляции экспрессии гена *uraA* *B.subtilis*.

У бактерий *B. subtilis* продукт гена *uraA* участвует в транспорте рибофлавина из окружающей среды в клетку. Первоначально функция гена *uraA* в качестве транспортера флавинов была предсказана на основании компьютерного анализа, а затем подтверждена экспериментальными результатами генетического и биохимического анализа (Kreneva, et al. 2000, Vogl, et al. 2007, Ott, et al. 2009). Что касается регуляции гена *uraA*, то она обусловлена присутствием в его регуляторной области эволюционно-консервативного участка, *rfn*-элемента, который обнаружен с помощью компьютерного анализа перед генами биосинтеза рибофлавина у бактерий различных таксономических групп (Gelfand, et al. 1999; Vitreschak, et al. 2002). На основании структурно-функционального анализа *rfn*-элемента гена *uraA* методом гидролиза РНК

(Winkler, et al. 2002) была предложена модель, согласно которой регуляция этого гена осуществляется не на уровне терминации транскрипции, как в случае *rib*-оперона, а в результате формирования альтернативных структур, одна из которых (в присутствии ФМН) приводит к образованию секвестра трансляции, блокирующего сайт связывания рибосомы SD. Однако прямых доказательств, что секвестрирование SD в присутствии ФМН приводит к подавлению трансляции гена *uraA* в работе (Winkler, et al. 2002) получено не было.

### **2.1. Изучение экспрессии транскрипционных и трансляционных фьюзов *uraA-LacZ* в клетках штамма *B. subtilis* RKH25 и его изогенного варианта *B. subtilis* RKH25-C1.**

Для проверки модели регуляции гена *uraA*, основанной на изменении конформации рибопереключател, был проведен сайт-направленный мутагенез лидерной области гена *uraA* (рис. 8). Так, мутация M5 (G95→A), расположенная в аптамерной части ФМН-зависимого рибопереключател, согласно данным рентгеноструктурного анализа комплекса *rfn*-элемента с ФМН (Serganov et al., 2009), должна оказывать влияние на эффективность связывания ФМН. Мутация M11 (A255→T; C256→T) располагается в экспрессионной платформе и влияет на стабильность шпильки секвестора. В то время как делеция *rfn*-элемента ( $\Delta rfn$ ) должна приводить к конститутивной экспрессии гена *uraA* с потерей чувствительности к ФМН.

Результаты эксперимента по определению активности  $\beta$ -галактозидазы для транскрипционных и трансляционных фьюзов лидерной области гена *uraA* дикого типа и ее мутантных вариантов с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора приведены в таблице 1.

На фоне мутации *ribC1* в случае лидерной области дикого типа наблюдается увеличение в уровне экспрессии репортерного гена для транскрипционного фьюза в 3,6 раза, а для трансляционного – в 12,3 раза (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что контроль экспрессии гена *uraA* у *B. subtilis*, опосредованный действием эндогенного ФМН, может осуществляться как на уровне трансляции, так и на уровне транскрипции. Нуклеотидная замена G95→A (M5) в лидерной области приводит к высокому уровню дерепрессии репортерного гена для всех рассматриваемых фьюзов *uraA-LacZ*. Такой результат свидетельствует о том, что мутация M5 отменяет негативный эффект ФМН на экспрессию гена *uraA*.

Таблица 1\*

Мутант	Нуклеотидная замена	Транскрипционные фьюзы <i>uraA-LacZ</i>		Трансляционные фьюзы <i>uraA-LacZ</i>	
		<i>B. subtilis</i> RKH25	<i>B. subtilis</i> RKH25-C1	<i>B. subtilis</i> RKH25	<i>B. subtilis</i> RKH25-C1
wt	-	205 (3,6)	737	173 (12,3)	2140
M5	G95→A	880	1635	1431	2281
M11	A255→T; C256→T	10	162	33	80
Δrfn	Δ(16A-189G)	11	16	4	5

\*Культуры штаммов *B. subtilis* выращивались на полноценной среде LB с добавлением хлорамфеникола 10 мкг/мл. Ночную культуру разводили в 25 раз свежей средой и растили при 37°C в течении 2,5-3 часов до достижения OD<sub>600</sub>=0.5-0.6. Активность β-галактозидазы выражена в единицах Миллера. В скобках приведены значения уровня репрессии активности β-галактозидазы в присутствии эндогенного ФМН. Приведенные значения - средние из 4 независимых определений.

Результаты определения активности β-галактозидазы у штаммов, содержащих трансляционные фьюзы мутантной лидерной области M11 с геном *lacZ* показывают, что усиление секвесторной шпильки приводит к практически полному подавлению экспрессии гена *uraA* как в присутствии (штамм RKH25), так и в отсутствии (штамм RKH25-C1) эндогенного ФМН. В случае транскрипционных фьюзов, содержащих лидерную область с мутацией M11, значения активности β-галактозидазы также снижаются. Из этого следует, что формирование шпилечной структуры секвестра трансляции и ее стабилизация в присутствии ФМН играет ключевую роль в ФМН-зависимой регуляции гена *uraA*.

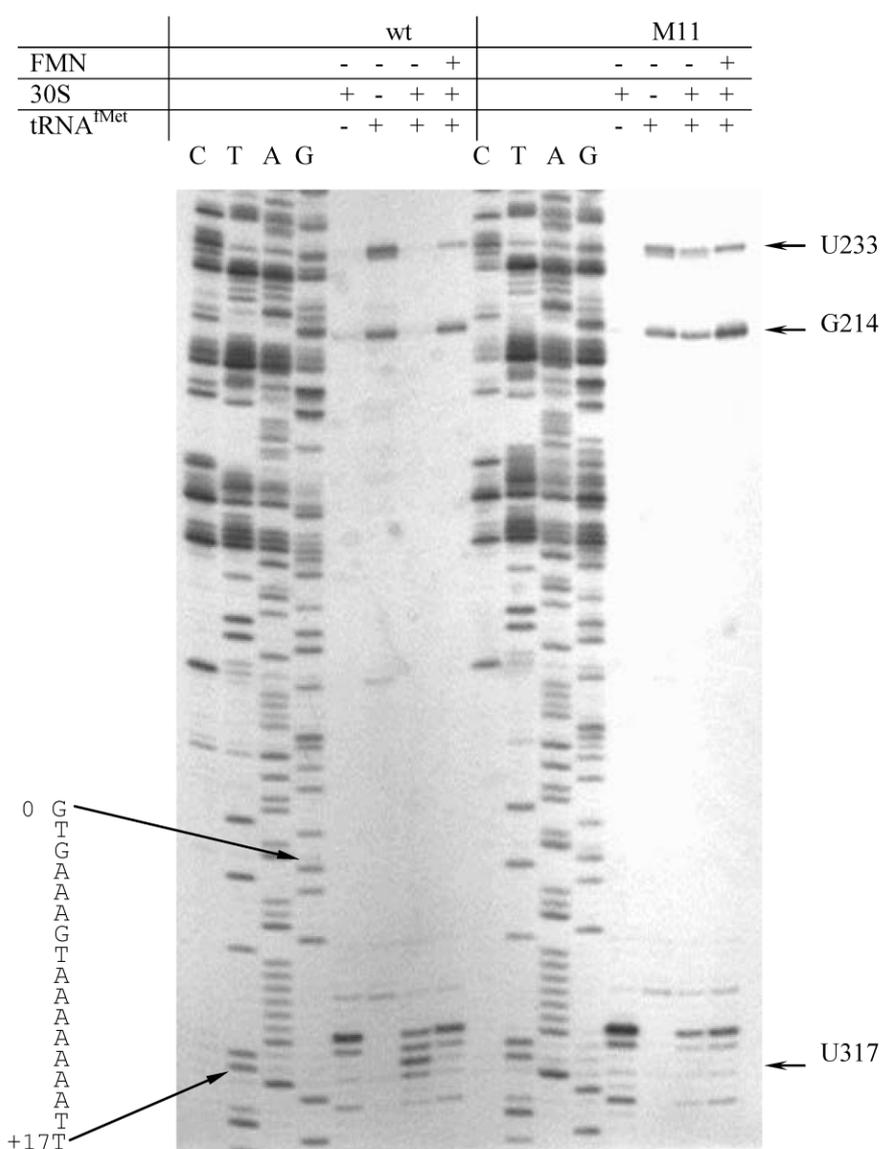
Делеционный мутант лидерной области гена *uraA* (*Δrfn*), лишенный аптамерной части, демонстрирует, вопреки ожиданиям, существенное снижение активности β-галактозидазы во всех рассматриваемых фьюзах. Похоже, что такая делеция не только устраняет чувствительность к ФМН, но и препятствует формированию альтернативных шпилечных структур, образование которых характерно для механизма действия рибопереключателей по принципу негативной регуляции в отсутствии лиганда, и которые способствуют экспрессии прилегающих генов.

### **2.3. Влияние ФМН на формирование 30S-инициаторного комплекса на лидерной мРНК гена *uraA* *B. subtilis*.**

Для получения прямого доказательства, что ФМН стабилизирует шпилечную структуру секвестра и препятствует связыванию 30S субъединицы рибосомы с SD-последовательностью, мы воспользовались методом тоупринт-анализа (Hartz, et al. 1988). Этот метод позволяет оценить доступность SD-

последовательности для связывания с 30S субъединицей рибосомы с помощью реакции обратной транскрипции, которая прерывается в результате формирования 30S-инициаторного комплекса в положении +16-+18 относительно первого нуклеотида иницирующего кодона (тоупринт-сигнал).

В отсутствие 30S субъединицы рибосомы, в процессе реакции обратной транскрипции происходит беспрепятственное удлинение праймера на матрице *uraA*-мРНК дикого типа, о чем свидетельствует образование продуктов реакции размером, соответствующем остановке в положении U233 и G214 относительно старта транскрипции (рис.4). Преинкубация матрицы в присутствии 30S субъединицы и тРНК<sup>fMet</sup>, но в отсутствие ФМН приводит к появлению нового сигнала, размер которого соответствует ожидаемому продукту реакции обратной транскрипции, который должен появляться при ее торможении в положении U317 в результате формирования иницирующего трансляцию комплекса. Из этого следует,

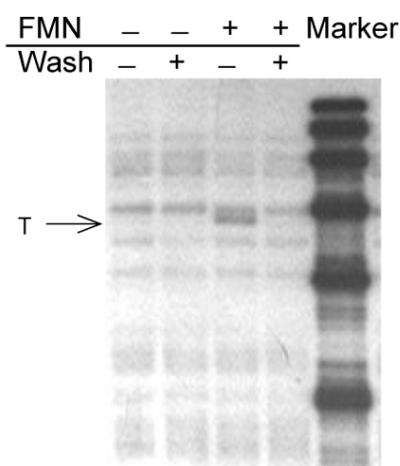


**Рисунок 4. Влияние ФМН на формирование 30S инициаторного комплекса на *uraA*- мРНК дикого типа и содержащей мутацию М11.** Стрелками слева показано положение G<sub>0</sub> и U<sub>+17</sub> нуклеотидов. Стрелками справа указаны продукты реакции обратной транскрипции, размер которых соответствует остановке в соответствующем положении относительно старта транскрипции.

что в отсутствие ФМН область мРНК, содержащая SD последовательность доступна для связывания с 30S субъединицей рибосомы. Однако если перед добавлением в преинкубационную смесь 30S субъединицы и тРНК<sup>fMet</sup> сначала внести 100 мкМ ФМН, то образования продукта U317 не наблюдается, и вновь появляются продукты реакции обратной транскрипции U233 и G214. На основании этих данных можно заключить, что в присутствии ФМН SD-последовательность оказывается недоступной для связывания 30S субъединицы рибосомы в результате формирования шпильчатой структуры секвестра (рис.8). Это заключение подтверждается результатами тоупринт-эксперимента с мутантной матрицей M11, которая содержит нуклеотидные замены, стабилизирующие шпильку секвестра трансляции.

#### 2.4. Транскрипция *in vitro* гена *uraA* на твердой фазе.

На следующем этапе мы исследовали влияние ФМН на транскрипцию гена *uraA*, поскольку данные *in vivo* (табл.1) не исключают такую вероятность. Для этого мы воспользовались методом проведения реакции транскрипции *in vitro* на твердой фазе. Преимущество такого подхода заключается в том, что иницирующий элонгационный комплекс иммобилизуется на твердой подложке, что позволяет в процессе реакции менять состав транскрипционной смеси, и таким образом, избавляться от не включенных в растущую цепь мРНК нуклеозидтрифосфатов, а также продуктов терминации. Анализ продуктов реакции транскрипции в 8% ПААГ показывает (рис. 5), что добавление ФМН вызывает преждевременную терминацию транскрипции в положении, соответствующем примерно 240 нуклеотиду. Удаление из геля указанного фрагмента после отмывки РНК свидетельствует о том, что фрагмент ~240 н. является продуктом терминации транскрипции, а не результатом остановки РНК-полимеразы на так называемых сайтах паузы.



**Рисунок 5. Терминация транскрипции *in vitro* гена *uraA* в зависимости от присутствия ФМН.** Справа обозначен размер соответствующих транскриптов для РНК-маркера. Положение ФМН-зависимой терминации обозначено стрелкой.

## 2.5. Изучение экспрессии транскрипционных фьюзов *uraA-lacZ* в клетках штамма *B. subtilis RibB110*.

Анализ нуклеотидной последовательности лидерной мРНК гена *uraA* на предмет формирования шпильчатых структур позволил идентифицировать наиболее вероятную структуру Rho-независимого терминатора транскрипции (шпилька VIII на рис. 8), формирование которого происходит в присутствии ФМН. Чтобы выяснить регуляторную роль шпильки VIII в экспрессии гена *uraA*, мы провели сайт-направленный мутагенез лидерной области и ввели нуклеотидные замены М9 (C212→G; C213→G) и М10 (G231→C; G232→C), нарушающие целостность у основания шпильки. Влияние полученных мутаций мы оценивали с помощью транскрипционных фьюзов лидерной области гена *uraA* с репортерным геном *lacZ*.

Чтобы выяснить, какую роль в ФМН-зависимой регуляции транскрипции гена *uraA* играет целостность лидерной области, были получены транскрипционные фьюзы лидерных областей гена *uraA* различной протяженности с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора. Так в состав лидерной области длиной 155 н. входит только *rhn*-элемент, длиной 214 н. содержит дополнительно шпильку VII (рис.8), длиной 256 н. включает шпильку терминатора, длиной 300 н. - полноразмерная лидерная область.

Определение активности β-галактозидазы проводили в клетках штамма *B. subtilis ribB110*, у которого мутация в гене *ribB*, кодирующем один из ферментов биосинтеза рибофлавина, приводит к ауксотрофии по этому

Таблица 2

Мутант	Длина лидерной области от старта транскрипции, н	Активность β-галактозидазы		Репрессия
		-	Рибофлавин 50μМ	
wt	155	348	294	1,2
wt	214	156	98	1,6
wt	256	141	37	<b>3,8</b>
wt	300	388	110	<b>3,5</b>
М9 C212→G; C213→G	300	405	342	1,2
М10 G231→C; G232→C	300	239	285	0,8
М9/10 C212→G; C213→G; G231→C; G232→C	300	240	170	1,4

Клетки растили на минимальной среде Спицайзена (0,4% глюкоза, 0,05% СА, 5мкг/мл Lys, Cml 5 мкг/мл) с добавлением рибофлавина 0,1 μМ при выращивании ночной культуры, утром клетки отмывали и разбавляли в 25 раз свежей средой без рибофлавина и с добавлением 50 μМ рибофлавина и растили при 37°C в течении 2,5-3 часов. Активность β-галактозидазы выражена в единицах Миллера. Приведенные значения - средние из 3 независимых определений.

компоненту. Таким образом, были смоделированы два физиологических условия в клетке: дерепрессия на фоне отсутствия эндогенного ФМН, и репрессия – когда в ростовую среду добавляется рибофлавин, превращающийся в ФМН внутри клетки.

В случае лидерной области, содержащей только аптамерную часть рибопереключателя, а именно *rfn*-элемент, наблюдается высокий уровень экспрессии репортерного гена независимо от ФМН (табл.2). Из этого следует, что в отсутствие экспрессионной платформы связывание ФМН с аптамерным участком рибопереключателя не оказывает регуляторного влияния на инициацию транскрипции с нативного промотора гена *uraA*. Увеличение лидерной области до 214 н. приводит к заметному снижению активности  $\beta$ -галактозидазы, однако чувствительность экспрессии данной конструкции к присутствию ФМН весьма незначительная. Наблюдаемое падение экспрессии репортерного гена, вероятнее всего, связано с действием шпильки VII (рис. 8), формирование которой, по-видимому, происходит независимо от ФМН. В то же время, в случае конструкции протяженностью 256 н., которая содержит шпильку VIII (рис.8) добавление рибофлавина в ростовую среду приводит к почти 4-х кратному снижению активности  $\beta$ -галактозидазы (табл. 2). В случае полноразмерной лидерной области гена *uraA* в условиях дерепрессии наблюдаются высокие значения активности  $\beta$ -галактозидазы (388 ед. по Миллеру), как и в случае лидерной области, в состав которой входит только *rfn*-элемент (348 ед. по Миллеру). При этом добавление рибофлавина понижает уровень экспрессии реперного гена *lacZ* в 3,5 раза. Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что негативная регуляция транскрипции гена *uraA* с помощью ФМН осуществляется посредством формирования Rho-независимого терминатора.

Оценить значение целостности терминаторной шпильки для регуляции гена *uraA* позволяют данные по определению активности  $\beta$ -галактозидазы у транскрипционных фьюзов мутантных лидерных областей с геном *lacZ*. Так, у мутанта М9 и М10 наблюдались высокие значения активности  $\beta$ -галактозидазы независимо от ФМН. Следовательно, дестабилизация терминаторной шпильки, вызванная внесением мутаций в левое и правое «плечо» шпильки VIII, соответственно (рис. 8), устраняет негативное влияние ФМН на транскрипцию гена *uraA*. В случае совмещения в одном геноме мутаций М9 и М10 (М9/10), комбинация которых восстанавливает целостность терминаторной шпильки, экспрессия реперного гена не достигает уровня дикого типа, однако чувствительность к действию ФМН восстанавливается.

## 2.6. Транскрипция лидерной мРНК гена *uraA* дикого типа и ее мутантных вариантов в системе *in vitro*.

Чтобы выяснить влияние мутаций на формирование Rho-независимого терминатора транскрипции, была проведена серия опытов по транскрипции *in vitro* с ДНК-матрицами, содержащими лидерную область гена *uraA* с нуклеотидными заменами.

Как следует из данных, представленных на рис. 6, в случае матрицы дикого типа добавление ФМН в транскрипционную смесь приводит к формированию четко выраженного сигнала размером ~240 нуклеотидов. У мутанта М9, содержащего нуклеотидные замены, приводящие к разрушению терминаторной шпильки полоса длиной 240 нуклеотидов, соответствующая преждевременной терминации, исчезает независимо от присутствия ФМН. У двойного мутанта М9/10, восстанавливающего целостность терминаторной шпильки VIII (рис. 8), преждевременная терминация транскрипции вновь наблюдается, причем даже в отсутствии ФМН, что подтверждает наше предположение о нарушении у этого мутанта формирования структуры анти-терминатора транскрипции. Как и следовало ожидать, у мутанта М11, содержащего нуклеотидные замены в области секвестра трансляции эффективность преждевременной терминации транскрипции неотличима от дикого типа.

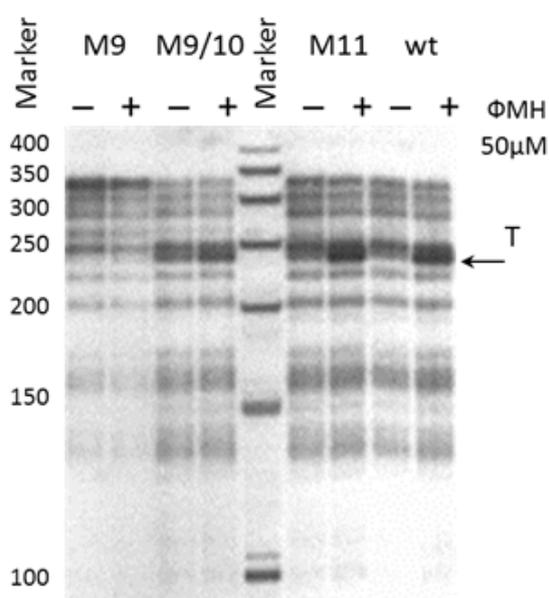


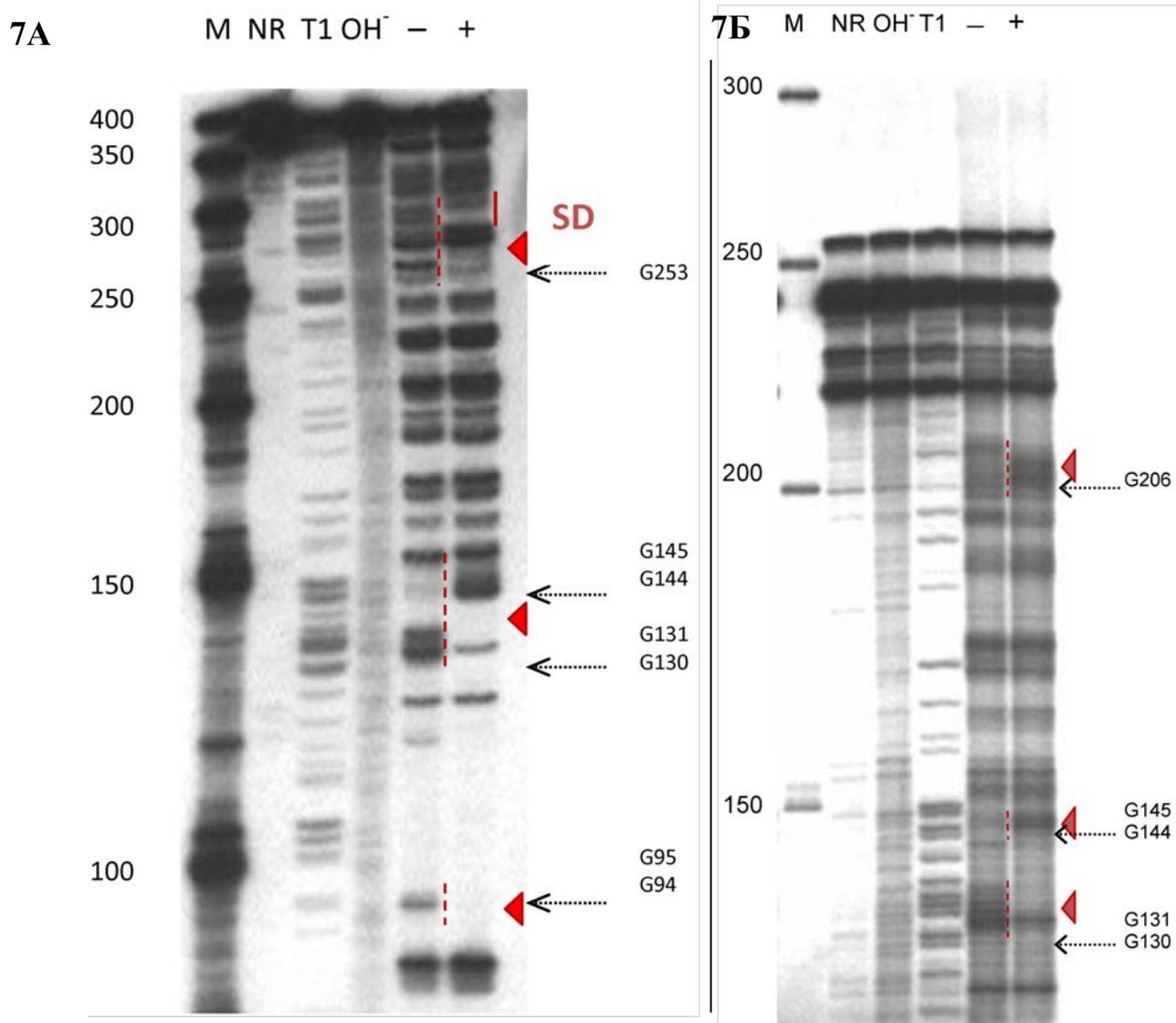
Рисунок 6. Транскрипция *in vitro* лидерной области гена *uraA* дикого типа и ее мутантных вариантов в зависимости от присутствия ФМН. Слева от рисунка указан размер соответствующих транскриптов для РНК-маркера. Положение ФМН-зависимой терминации обозначено стрелкой

## 2.7. Изучение вторичной структуры лидерной мРНК гена *uraA* методом гидролиза РНК (“*In line probing*”).

Чтобы уточнить модель регуляции гена *uraA* с участием ФМН-связывающего рибопереключатателя, необходимо было выявить альтернативные регуляторные элементы (анти-терминатор и анти-секвестр), которые реализуются в процессе фолдинга лидерной мРНК в отсутствие ФМН. Для

этого мы воспользовались методом спонтанного гидролиза РНК или «In line probing», суть которого заключается в том, что та область РНК, которая не связана с метаболитом и находится в одноцепочечной форме, подвергается более эффективному спонтанному расщеплению посредством внутренней трансэстерификации.

На рисунке 7А представлен опыт по гидролизу лидерной мРНК размером 380 нуклеотидов. В области сайта связывания рибосомы (SD) обнаруживаются значительные структурные изменения в профиле гидролиза РНК в зависимости

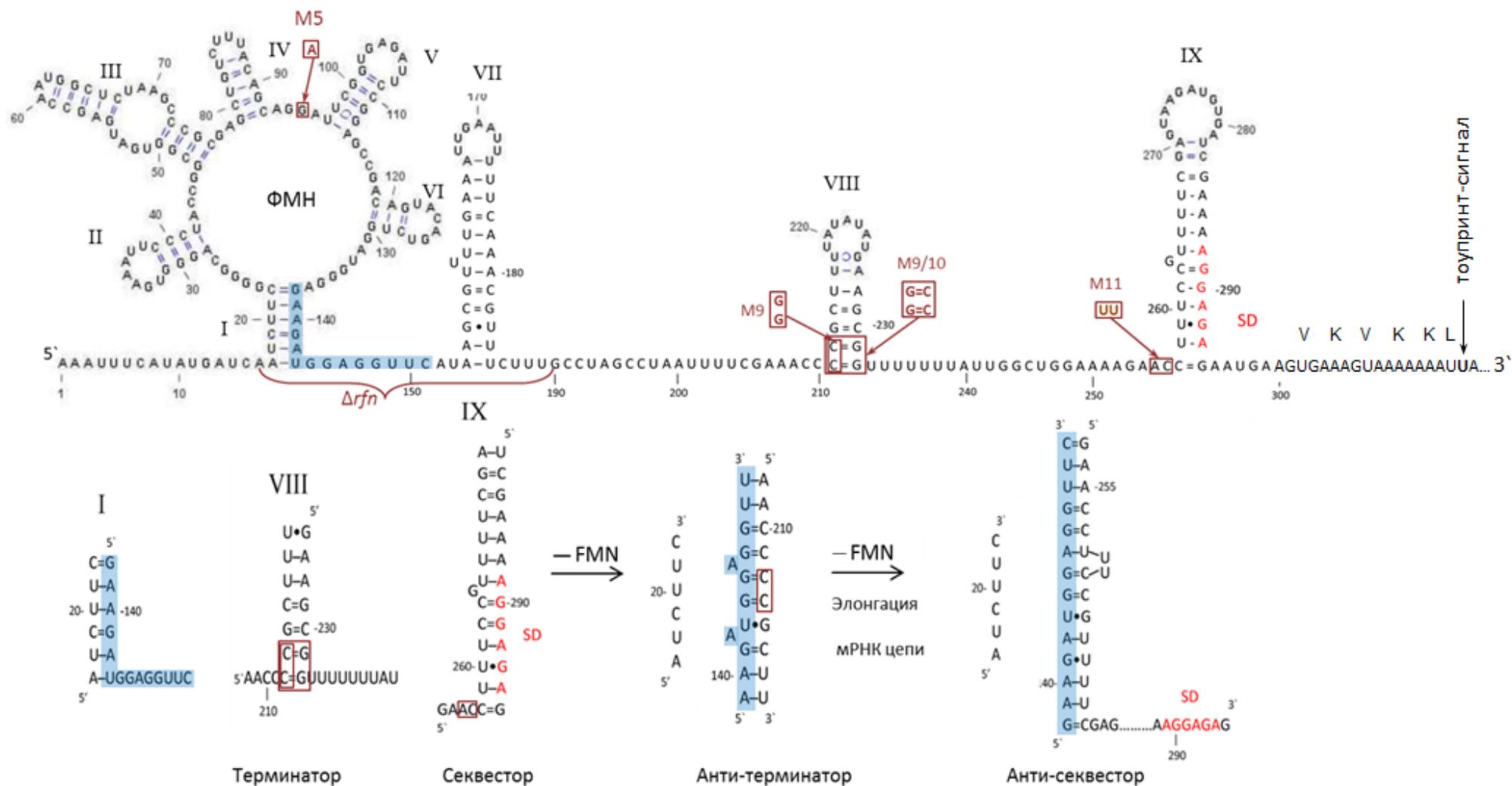


**Рисунок 7. Спонтанный гидролиз мРНК гена *uraA*, длиной 380 (А) и 240 (Б) нуклеотидов.** Первая дорожка соответствует РНК-маркеру, длина транскриптов которого обозначена слева от рисунка. Вторая дорожка соответствует РНК, которая не подвергалась расщеплению (NR); T1 – продукты специфического расщепления РНК с помощью РНКазы T1, OH<sup>-</sup> – продукты щелочного гидролиза РНК. Пунктирными линиями на рисунке обозначены области с различной степенью расщепления в зависимости от присутствия ФМН. Последовательность SD обозначена сплошной линией. Стрелками справа указаны соответствующие продукты реакции, идентифицированные в результате специфического действия РНКазы T1.

от ФМН: в отсутствие ФМН нуклеотиды 290-294 подвержены более активному гидролизу, т.е., вероятно, находятся в одноцепочечной конфигурации, тогда как в присутствии ФМН устойчивы к гидролизу из-за формирования двунитевой шпильчатой структуры IX секвестра (рис. 8). В то же время нуклеотиды 144-147 характеризуются повышенным уровнем гидролиза в присутствии ФМН, но устойчивы к гидролизу в отсутствие ФМН. Из чего следует, что указанные нуклеотиды могут быть вовлечены в формирование структуры потенциального анти-секвестра трансляции, наиболее вероятная последовательность которого обозначена на рис.8.

Поскольку в районе локализации предполагаемого терминатора транскрипции (нуклеотиды 210-240) профиль гидролиза не меняется в зависимости от ФМН, было высказано предположение, что участки анти-секвестра и анти-терминатора могут перекрываться. Поэтому был проведен опыт по гидролизу РНК на укороченной матрице лидерной мРНК, длиной 240 нуклеотидов, которая не содержит последовательности секвестра трансляции (рис. 7Б). В этом случае нуклеотиды 206-210 в отсутствие ФМН менее подвержены гидролизу и, по-видимому, вовлекаются в формирование потенциального анти-терминатора с теми же нуклеотидами, локализованными в положении, которые, как было показано выше, участвуют в формировании анти-секвестра трансляции. Об этом свидетельствует менее эффективный гидролиз РНК в районе 144-148 нуклеотидов в отсутствие ФМН.

Данные по спонтанному гидролизу РНК свидетельствуют о том, что, по-видимому, в образовании анти-терминатора транскрипции и анти-секвестра трансляции, участвует одна и та же область лидерной мРНК, входящая в состав правого плеча шпильки I. Для интерпретации полученных данных мы выдвигаем гипотезу «динамической регуляции» экспрессии гена *uraA* с участием ФМН зависимого рибопереключателея. В отсутствие ФМН в процессе транскрипции гена *uraA*, сначала формируется структура анти-терминатора, позволяющая дальнейшую транскрипцию структурной части гена. Далее по мере удлинения транскрипта мРНК, включающего полноразмерную лидерную область, происходят структурные изменения в конфигурации мРНК-транскрипта, в результате чего образуется структура анти-секвестра, разрешающая трансляцию гена *uraA*.



**Рисунок 8 . Модель регуляции экспрессии гена *uraA* *B. subtilis* с помощью ФМН-зависимого рибопереклювателя. (А) Вторичная структура лидерной области в присутствии ФМН. (Б) Регуляторные элементы, реализующиеся в зависимости от ФМН. Шпильчатые структуры пронумерованы римскими цифрами. Соответствующие нуклеотидные замены выделены рамкой. Делеционный мутант показан фигурной скобкой. Сайт связывания рибосомы SD выделен красным цветом. Область аптамерной части ФМН-зависимого рибопереклювателя, участвующего в формировании альтернативных структур выделена маркером. Положение тоупринт-сигнала обозначено жирным шрифтом и стрелкой.**

### 3. Исследование регуляции экспрессии гена *ribB E.coli*.

Методами сравнительного компьютерного анализа регуляторных областей *rib*-генов у бактерии *E.coli* был обнаружен консервативный *rfn*-элемент только перед структурным геном *ribB*, который кодирует 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу (Vitreschak, et al. 2002). В работе (Еремина, et al. 2008) было показано, что регуляция экспрессии этого гена осуществляется с помощью ФМН-зависимого рибопереключателя. Так, связывание ФМН с лидерной областью гена *ribB* у *E.coli*, приводит к формированию шпильки секвестра трансляции, блокирующего сайт связывания рибосомы (рис. 9). Имеются указания на то, что помимо контроля экспрессии гена *ribB* на уровне инициации трансляции может иметь место регуляция этого гена на транскрипционном уровне. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что в клетках *E.coli* идентифицирована малая РНК *sgoG*, соответствующая лидерной области гена *ribB* (Peters, et al. 2009; Vogel, et al. 2003). Структура этой малой РНК содержит лиганд-связывающий домен и не содержит Rho-независимого терминатора. Изучению регуляции транскрипции гена *ribB E.coli* и будет посвящен данный раздел.

#### 3.1. Изучение экспрессии транскрипционных фьюзов *ribB-LacZ* в клетках штамма *E.coli* AM4002.

Поскольку в лидерной области гена *ribB* не обнаружен Rho-независимый терминатор транскрипции, мы предположили, что образование короткого транскрипта, соответствующего по длине малой РНК *sgoG*, может происходить в результате Rho-зависимой терминации. Для проверки этого предположения,

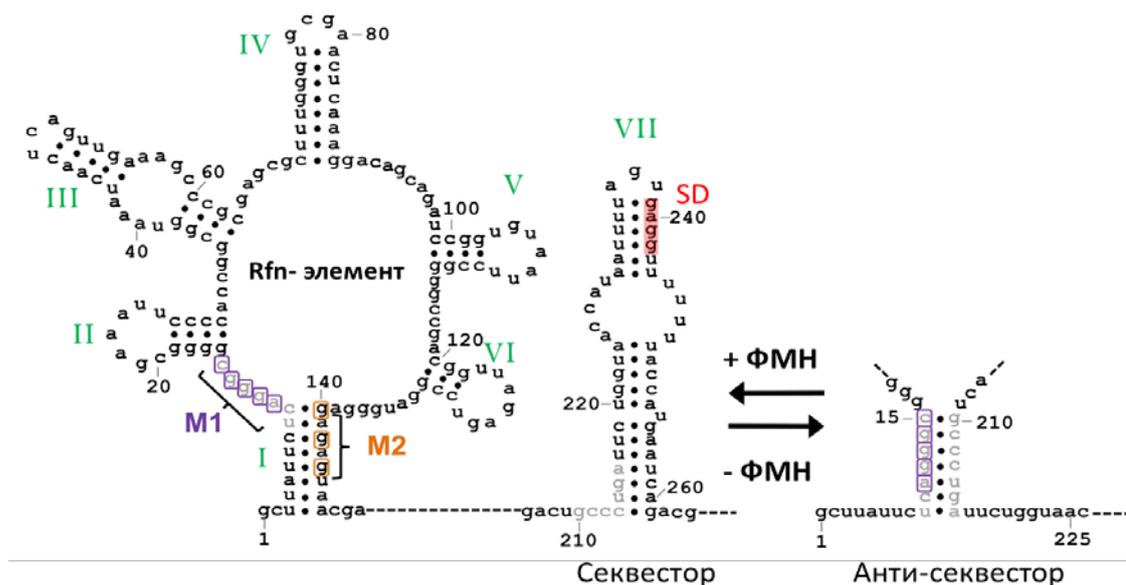
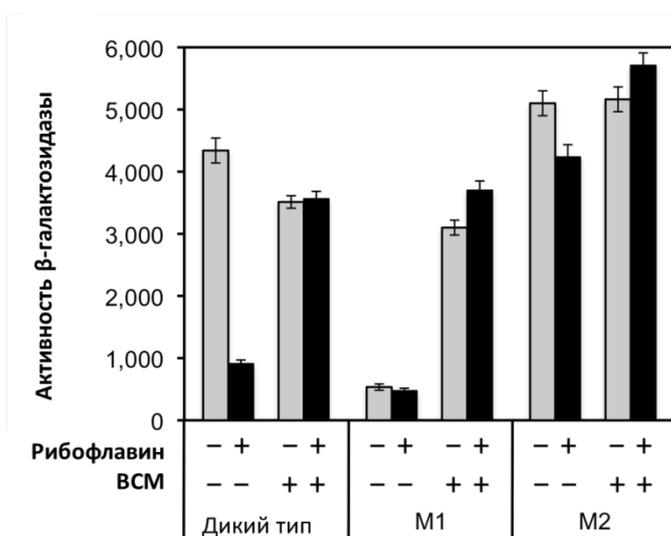


Рисунок 9. Структура ФМН-зависимого рибопереключателя гена *ribB E.coli* в зависимости от ФМН. Нуклеотиды, формирующие стембель шпильки анти-секвестора в отсутствии связывания с ФМН, выделены серым цветом. Соответствующие нуклеотидные замены выделены рамкой и обозначены фигурной скобкой.

мы изучали эффект специфического ингибитора Rho-фактора антибиотика бицикломицина (ВСМ) на изменение активности  $\beta$ -галактозидазы для транскрипционных фьюзов лидерной области гена *ribB* дикого типа, а также ее мутантные варианты М1 и М2 с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора. Нуклеотидные замены, соответствующие мутации М1 (A11→Т, G12→С, G13→С, G14→С, С15→Т), стабилизируют конфигурацию рибопереключателю «+ФМН». Пространственная структура лидерной области с нуклеотидными заменами М2 (G140→А, G142→А, G144→А) независимо от присутствия ФМН принимает конфигурацию рибопереключателю «-ФМН» (рис.9).

Активность  $\beta$ -галактозидазы у транскрипционных фьюзов *ribB-LacZ* измерялась в клетках штамма *E.coli* AM4002, у которого наличие Tn5 в гене *ribB* нарушает биосинтез рибофлавина, а наличие Tn10 в гене *lacZ* позволяет использовать этот штамм в качестве реципиента для полученных конструкций. Результаты эксперимента представлены на рисунке 10. В случае транскрипционного фьюза лидерной области дикого типа с геном *lacZ* в присутствии рибофлавина активность  $\beta$ -галактозидазы снижается почти в 5 раз. Однако добавление ВСМ снимает репрессирующее действие рибофлавина – предшественника ФМН. Внесение мутаций М1 и М2, стабилизирующих две альтернативные структуры рибопереключателю независимо от присутствия ФМН, позволяет оценить влияние конфигурации рибопереключателю на возможность Rho-зависимой терминации транскрипции гена *ribB*. В случае мутантной лидерной области М1 независимо от присутствия рибофлавина в среде происходит подавление экспрессии репортерного гена.



**Рисунок 10. Влияние бицикломицина на активность  $\beta$ -галактозидазы для транскрипционных фьюзов *ribB-LacZ*.** Культуры клеток *E.coli* AM4002, содержащие транскрипционные фьюзы лидерной области гена *ribB* дикого типа и ее мутантных вариантов М1 и М2 с репортерным геном *lacZ*, выращивали при 30°C в течение ночи на полноценной среде LB с добавлением 50  $\mu$ M рибофлавина и 50 мкг/мл ампициллина. Затем клетки отмывали и разбавляли в 25

раз свежей средой, содержащей либо нет 50  $\mu$ M рибофлавина и/или с 25 мкг/мл ВСМ в зависимости от варианта. Клетки растили при 30°C в течение 2-2,5 часов до средней экспоненциальной фазы роста.

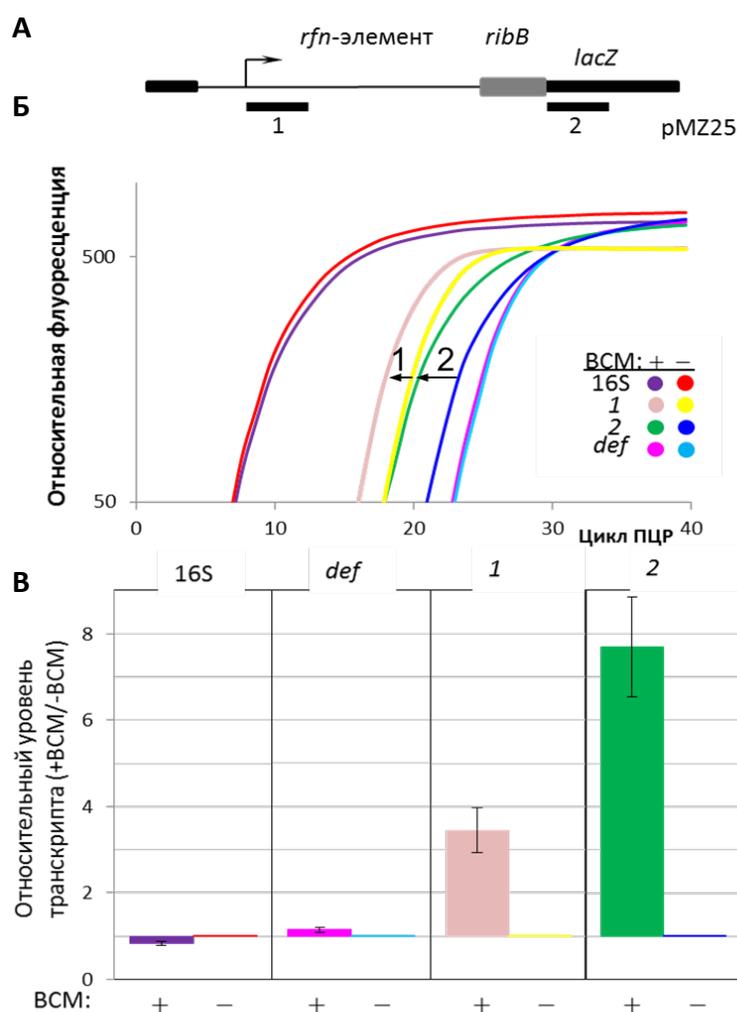
Так, уровень активности  $\beta$ -галактозидазы остается низким в условиях дерепрессии и соответствует значению, характерному для транскрипционного фьюза лидерной области дикого типа с *lacZ* в присутствии рибофлавина. Добавление ВСМ в случае мутантной лидерной области М1 приводит к значительному увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы независимо от присутствия рибофлавина в ростовой среде. Для транскрипционных фьюзов лидерной области с мутацией М2, имитирующей структуру рибопереключателя «-ФМН», наблюдаются высокие значения активности  $\beta$ -галактозидазы и добавление ВСМ не сказывается на изменении этих значений.

Результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что преждевременная терминация транскрипции гена *ribB* в присутствии ФМН обусловлена действием Rho-фактора. Более того, эндогенный ФМН приводит к Rho-зависимой терминации вследствие определенной конфигурации рибопереключателя, реализующейся при взаимодействии ФМН с *rfn*-элементом, что подтверждается данными транскрипционных фьюзов мутантных лидерных областей М1 и М2 с геном *lacZ*.

### **3.2. Изучение транскрипции гена *ribB* на фоне ингибирования Rho-фактора методом RT-qPCR.**

Чтобы оценить эффект специфического ингибитора Rho-фактора ВСМ на транскрипцию гена *ribB* *E.coli* в условиях репрессии рибофлавином, мы воспользовались методом количественной ПЦР сопряженной с обратной транскрипцией. Для этого эксперимента была выделена суммарная РНК из штамма *E.coli* AM4002 рМЗ25, содержащего плазмиду с транскрипционным фьюзом лидерной области гена *ribB* дикого типа с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора. Рекомбинантный штамм растили на полноценной LB-среде в присутствии 50 $\mu$ М рибофлавина и либо с добавлением 25 мкг/мл ВСМ, либо в его отсутствии. Для реакции обратной транскрипции использовали по 0,05 мкг суммарной РНК в качестве матрицы.

В результате проведенного эксперимента (рис. 11) мы обнаружили, что добавление ВСМ при выращивании клеток в условиях репрессии, способствует 8-кратному увеличению количества полноразмерного транскрипта (фрагмент 2). Увеличение в 3,5 раза уровня транскрипции лидерной области гена *ribB* под действием ВСМ (фрагмент 1), по-видимому, связано со сквозной транскрипцией, осуществляемой с расположенного выше промотора.



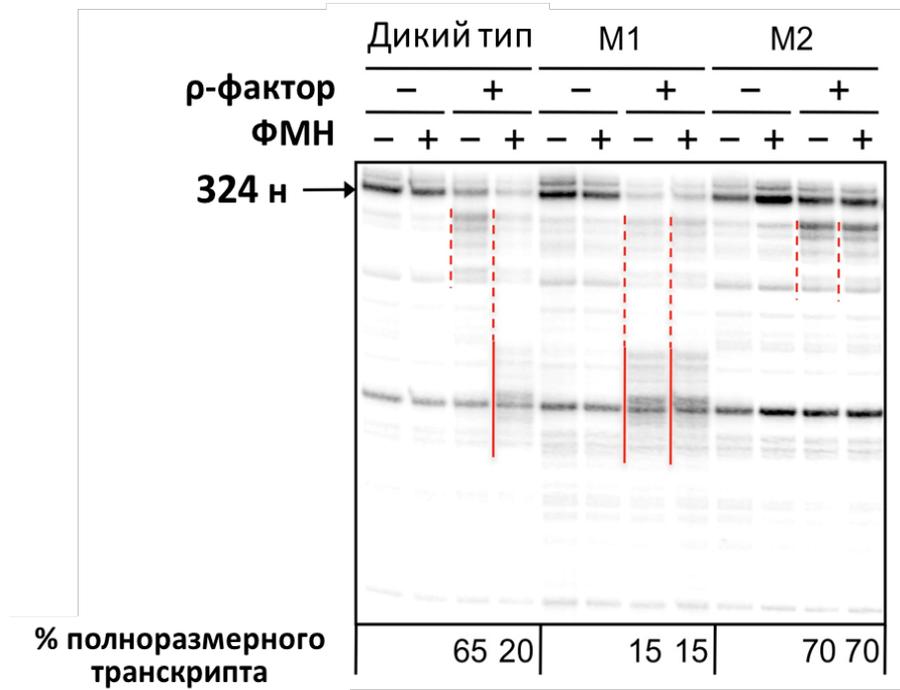
**Рисунок 11. Влияние VSM на транскрипцию гена *ribB* *E.coli* в условиях репрессии рибофлавином.** (А) Структура плазмиды pMZ25, в полилинкерную область которой был клонирован фрагмент лидерной области гена *ribB* с нативным промотором, за которой расположен структурный ген *lacZ*. Цифрами 1 и 2 обозначены фрагменты, за амплификацией которых следили с помощью количественной ПЦР. (Б) График накопления флуоресцентного сигнала в логарифмических координатах в зависимости от ПЦР-цикла. (В) Относительный уровень транскрипции областей 1 и 2 с *ribB*-промотора. Амплификация области 16S рРНК и области мРНК гена, кодирующего деформилазу (*def*) была проведена для внутреннего контроля. Относительный уровень транскрипта отражает количество мРНК, выделенной из клеток, выращенных в условиях репрессии рибофлавином при

добавлении VSM по отношению к мРНК, выделенной из клеток, выращенных без VSM.

### 3.3. Влияние Rho-фактора на элонгацию транскрипции гена *ribB* в очищенной системе *in vitro*.

Результаты экспериментов по проведению реакции транскрипции *in vitro* свидетельствуют о том, что в случае лидерной области дикого типа добавление ФМН в отсутствие Rho-фактора, не влияет на процесс транскрипции, и мы наблюдаем накопление продукта реакции, размером 324 н (рис. 12). При добавлении Rho-фактора в реакционную смесь характер транскрипции меняется. В отсутствие трансляции Rho-фактор стимулирует терминацию транскрипции лидера дикого типа, при этом в присутствии ФМН преждевременная терминация наступает значительно раньше (показано сплошной линией на рис. 12) и происходит с большей эффективностью, по сравнению с тем, когда ФМН в реакционную смесь не добавляли. В случае мутации M1, которая имитирует структуру рибопереключателея «+ФМН», Rho-зависимая терминация происходит независимо от присутствия ФМН и наблюдается в том же положении, как при транскрипции лидерной области

дикого типа в присутствии ФМН. В случае мутации М2, стабилизирующей альтернативную конфигурацию рибопереключателя, Rho-зависимая терминация существенно ослабляется (количество полноразмерного транскрипта составляет 70%) и происходит в положении, характерном для реакции транскрипции лидерной области дикого типа без ФМН.



**Рисунок 12.** Транскрипция лидерных областей гена *ribB* дикого типа, а также ее мутантных вариантов в очищенной системе *in vitro* в присутствии ФМН и/или *Rho*-фактора. Сплошной красной линией показана область Rho-зависимой терминации, наблюдаемой для лидерной области дикого типа в присутствии ФМН. Прерывистой красной линией показана область Rho-зависимой терминации, наблюдаемой для лидерной области дикого типа без ФМН.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятность Rho-зависимой терминации определяется пространственной структурой рибопереключателя. Так, связывание ФМН с *rfn*-элементом, приводит к формированию такой конфигурации рибопереключателя, которая позволяет Rho-фактору завершить транскрипцию структурной части гена *ribB*, до того как синтезируется SD-последовательность. Таким образом, помимо контроля трансляции гена *ribB*, ФМН-связывающий рибопереключател регулирует транскрипцию гена *ribB* на уровне Rho-зависимой терминации.

## ВЫВОДЫ

1. Определены старты транскрипции внутренних промоторов P2 и P3 *rib*-оперона *B.subtilis*. Показано, что главную роль в регуляции экспрессии генов *rib*-оперона играет основной промотор P1. Установлено, что транскрипционная активность промотора P3 в 5 раз выше чем у основного промотора P1, тогда как активность промотора P2 на два порядка ниже. В отличие от промотора P1, экспрессия с промоторов P2 и P3 не регулируется флавинами.
2. Связывание ФМН с лидерной областью гена *uraA B.subtilis* приводит к формированию Rho-независимого терминатора транскрипции, снижающего уровень экспрессии структурной части гена.
3. Установлено, что формирование инициаторного комплекса 30S субъединицы рибосомы с SD-последовательностью лидерной мРНК гена *uraA B.subtilis* блокируется в присутствии ФМН. Таким образом, регуляция экспрессии гена *uraA B.subtilis* осуществляется как на уровне терминации транскрипции, так и на уровне инициации трансляции.
4. В формировании альтернативных структур (анти-терминатора и анти-секвестра), обеспечивающих эффективную экспрессию гена *uraA B.subtilis*, участвует одна и та же область лидерной мРНК. Предложена динамическая модель ФМН-зависимого фолдинга лидерной мРНК гена *uraA*, объясняющая комбинативное действие рибопереключателея на уровне транскрипции и трансляции.
5. На модели гена *ribB E.coli* обнаружен новый механизм регуляции с участием рибопереключателея, действующий на уровне Rho-зависимой терминации транскрипции. В присутствии ФМН в лидерной мРНК гена *ribB* происходит формирование структуры, обеспечивающей связывание фактора Rho, что приводит к подавлению дальнейшей транскрипции структурной части гена *ribB E.coli* в результате Rho-зависимой терминации.

**Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Склярова С.А., Кренева Р.А, Перумов Д.А., Миронов А.С. Характеристика внутренних промоторов оперона биосинтеза рибофлавина у *Bacillus subtilis* // Генетика. 2012. Т48. №10. С.1-9
2. Hollands K., Proshkin S., Sklyrova S., et al. Riboswitch control of *Rho*-dependent transcription termination // Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109(14). P. 5376-81
3. Склярова С.А., Миронов А.С. Механизм регуляции гена *uraA* *Bacillus subtilis* с участием ФМН-связывающей сенсорной РНК // Генетика. 2014. Т50. №3. С.1-5
4. Склярова С.А., Прошкин С.А., Миронов А.С. Сенсорная РНК контролирует *Rho*-зависимую терминацию транскрипции лидерной области гена *ribB* *E. coli*. Материалы 16-ой Международной школы-конференции молодых ученых «Биология Наука XXI века» Пущино, 16-21 апреля 2012 г.,
5. Sklyarova S., Mironov A. The transcriptionally- and translationally acting *uraA* riboswitch in *Bacillus subtilis* // FEBS J. 2013 Jul. 280 Suppl 1. C.45