

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ»
(ФГУП «ГОСНИИГЕНЕТИКА»)

На правах рукописи

Склярова Светлана Анатольевна

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

Специальность 03.02.07 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
Миронов Александр Сергеевич

Москва 2014

Оглавление	стр.
ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. Биосинтез рибофлавина и его производных у бактерий	10
1.1. Пути биосинтеза рибофлавина у бактерий.....	10
1.1.1. ГТФ-циклогидролаза II.....	12
1.1.2. Редуктаза и дезаминаза.....	13
1.1.3. Дефосфорилирование 5-амино-6-(рибителиамино)-2,4(1H,3H)- пиримидиндион-5'-фосфата.....	13
1.1.4. 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза.....	14
1.1.5. Люмазинсинта.....	14
1.1.6. Рибофлавинсинтаза.....	15
1.1.7. Биосинтез флавиновых нуклеотидов, ФМН и ФАД.....	16
1.2. Гены биосинтеза рибофлавина и его производных.....	17
2. Регуляция экспрессии генов посредством рибопереключателей у бактерий	22
2.1. Разнообразие рибопереключателей у бактерий.....	23
2.2. Аналоги лигандов рибопереключателей как антимикробные соединения.....	27
2.3. Механизмы действия рибопереключателей.....	29
2.3.1. Роль Rho-фактора в регуляции экспрессии генов с участием рибопереключателей.....	33
2.4. Структурная организация рибопереключателей.....	35
2.5. ФМН-связывающие рибопереключатели.....	38
2.5.1. Пространственная структура <i>rfn</i> -элемента.....	39
2.5.2. Механизмы действия ФМН-связывающих рибопереключателей.....	41
2.5.2.1. Регуляция генов, вовлеченных в биосинтез рибофлавина	41
2.5.2.2. Регуляция генов, вовлеченных в транспорт рибофлавина	43
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46

3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды.....	46
3.2. Состав питательных сред, используемых для выращивания бактерий.....	47
3.3. Выделение хромосомной ДНК из бактерий <i>B.subtilis</i>	48
3.4. Выделение плазмидной ДНК из <i>E.coli</i>	49
3.5. Трансформация бактерий	49
3.5.1. Трансформация <i>E.coli</i>	49
3.5.2. Трансформация <i>B.subtilis</i>	49
3.6. Конструирование транскрипционных фьюзов <i>ribP₁₋₃-lacZ</i> в гене <i>amyE</i> хромосомы <i>B.subtilis</i>	50
3.7. Конструирование транскрипционных фьюзов, локализованных в области <i>rib</i> -оперона <i>B.subtilis</i>	51
3.8. Сайт-направленный мутагенез.....	52
3.9. Конструирование транскрипционных и трансляционных фьюзов <i>uraA-</i> <i>lacZ</i> в гене <i>amyE</i> хромосомы <i>B.subtilis</i>	53
3.10. Конструирование транскрипционных фьюзов <i>ribB-lacZ</i>	54
3.11. Определение активности β-галактозидазы	55
3.11.1. В культуре клеток <i>E.coli</i>	55
3.11.2. В культуре клеток <i>B.subtilis</i>	55
3.12. Выделение суммарной РНК из бактериальных клеток.....	56
3.13. Определение старта транскрипции.....	57
3.14. Транскрипция <i>in vitro</i>	58
3.15. Транскрипция <i>in vitro</i> на твердой фазе.....	58
3.15.1. Определение расположения Rho-независимого терминатора транскрипции гена <i>uraA B.subtilis</i>	59
3.15.2. Транскрипция лидерной области гена <i>ribB E.coli</i> в очищенной системе <i>in vitro</i>	60
3.16. Анализ формирования 30S-инициаторного комплекса на мРНК (тоупринт-анализ).....	61
3.17. Анализ вторичной структуры РНК («In-line probing»).....	62

3.18. Количественная ПЦР (RT-qPCR).....	63
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	66
4. Изучение структурно-функциональной организации внутренних промоторов рибофлавинового оперона <i>B. subtilis</i>.....	66
4.1. Определение старта транскрипции внутренних промоторов P2 и P3 <i>rib</i> -оперона	67
4.2. Оценка силы промоторов <i>rib</i> -оперона	70
4.3. Определение уровня транскрипции генов <i>ribB</i> , <i>ribA</i> и <i>ribT</i> в составе <i>rib</i> -оперона	71
4.4. Изучение уровня транскрипции генов <i>rib</i> -оперона с помощью RT-qPCR	73
5. Исследование регуляции экспрессии гена <i>uraA B.subtilis</i>.....	80
5.1. Определение структуры промотора гена <i>uraA B.subtilis</i>	81
5.2. Изучение экспрессии транскрипционных и трансляционных фьюзов <i>uraA-LacZ</i> в клетках штамма <i>B. subtilis</i> RKH25 и его изогенного варианта <i>B. subtilis</i> RKH25-C1.....	82
5.3. Влияние ФМН на формирование 30S-инициаторного комплекса на лидерной мРНК гена <i>uraA B.subtilis</i>	86
5.4. Транскрипция <i>in vitro</i> гена <i>uraA</i> на твердой фазе.....	88
5.5. Изучение экспрессии транскрипционных фьюзов <i>uraA-LacZ</i> в клетках штамма <i>B. subtilis</i> RibB110	90
5.6. Транскрипция лидерной мРНК гена <i>uraA</i> дикого типа и ее мутантных вариантов в системе <i>in vitro</i>	94
5.7. Изучение вторичной структуры лидерной мРНК гена <i>uraA</i> методом гидролиза («In line probing»).....	96
6. Исследование регуляции экспрессии гена <i>ribB E.coli</i>	102
6.1. Изучение экспрессии транскрипционных фьюзов <i>ribB-LacZ</i> в клетках штамма <i>E.coli</i> AM4002	102
6.2. Определение доли полноразмерного транскрипта гена <i>ribB</i> методом «достройки праймера».....	106

6.3. Изучение транскрипции гена <i>ribB</i> на фоне ингибирования Rho-фактора методом RT-qPCR.....	107
6.4. Влияние Rho-фактора на элонгацию транскрипции гена <i>ribB</i> в очищенной системе <i>in vitro</i>	109
ОБСУЖДЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	122

ВВЕДЕНИЕ

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 *B.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 *uraA* *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 рибопереключателея 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*.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биосинтез рибофлавина и его производных у бактерий

Рибофлавин (или витамин В₂) относится к группе водорастворимых витаминов и является необходимым элементом питания человека и животных. Впервые рибофлавин был открыт в 1879 году ученым Блисом как «желтый пигмент» молока и получил название лактофлавин. Его химическая структура была расшифрована Паулем Каррером (Цюрих, Швейцария) и Ричардом Куном (Гейдельберг, Германия) в 1930 году. За исследования в области каротиноидов и витаминов они были удостоены Нобелевской премией по химии в 1937 и 1938 годах, соответственно. Используемое в настоящее время название «рибофлавин», отражает наличие сахарного спирта рибита в его молекуле, а также желтый цвет вещества.

Рибофлавин, как правило, не участвует в метаболических процессах внутри клетки напрямую. Его биологическая роль связана с тем, что он служит предшественником для синтеза флавиновых коферментов, таких как флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Флавокоэнзимы, которые образуются в результате связывания флавиновых коферментов с белками, катализируют широкий спектр окислительно-восстановительных реакций в биологических системах, поскольку они способны переносить как один, так и два электрона от атомов водорода и гидрид-ионов. Кроме того, флавины участвуют во многих других физиологических процессах, таких как светочувствительность, биолюминесценция, циркадные ритмы, репарация ДНК.

В настоящее время в промышленности большая часть рибофлавина производится с помощью микробного синтеза. В качестве продуцентов используются специальные штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, плесени *Ashbya gossypii* и дрожжей *Candida famata* (*Candida flareri*). Если раньше сверхпродуценты рибофлавина получали методом классической селекции, то в настоящее время высоко-эффективные штаммы-продуценты совершенствуются с помощью современных подходов к метаболической

инженерии, которые включают сверхэкспрессию структурных и регуляторных генов биосинтеза рибофлавина, а также гены, вовлеченные в биосинтез пуринового предшественника рибофлавина – гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ).

1.1. Пути биосинтеза рибофлавина у бактерий

В отличие от животных и некоторых прокариотов (некоторые лактобактерии), все растения и грибы, а также большинство бактерий способны синтезировать рибофлавин *de novo*. Биохимические пути синтеза рибофлавина у растений, бактерий и грибов весьма похожи, но не являются полностью идентичными.

Биосинтез рибофлавина, представленный на рис. 1, начинается с одной молекулы ГТФ и двух молекул рибулозо-5'-фосфата. ГТФ-циклогидролаза II (рис. 1, реакция 1) катализирует освобождение формиата от имидазольного кольца и высвобождение пирофосфата боковой цепи нуклеотидного предшественника, что приводит к образованию 2,5-диамино-6-(рибозиламино)-4(3Н)-пиримидинон-5'-фосфата. На следующих этапах биосинтеза (рис. 1, реакция 2-6) происходит гидролитическое удаление аминогруппы в положении 2, уменьшение боковой цепи и дефосфорилирование с образованием 5-амино-6-(рибитиламино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндиона. Очередность процессов дезаминирования и редукции боковой цепи варьирует в разных таксономических группах. В эубактериях стадия дезаминирования предшествует стадии уменьшения боковой цепи, в то время как у дрожжей и грибов данные процессы происходят в обратной последовательности [47; 48; 119]. Следует отметить, что 5-амино-6-(рибитиламино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндион-5'-фосфат не является субстратом для 6,7-диметил-8-рибитиллюмазинсинтазы. Это соединение проходит стадию дефосфорилирования перед дальнейшим превращением. К настоящему моменту об этом важном этапе в биосинтезе рибофлавина ничего не известно. Далее дефосфолированное производное

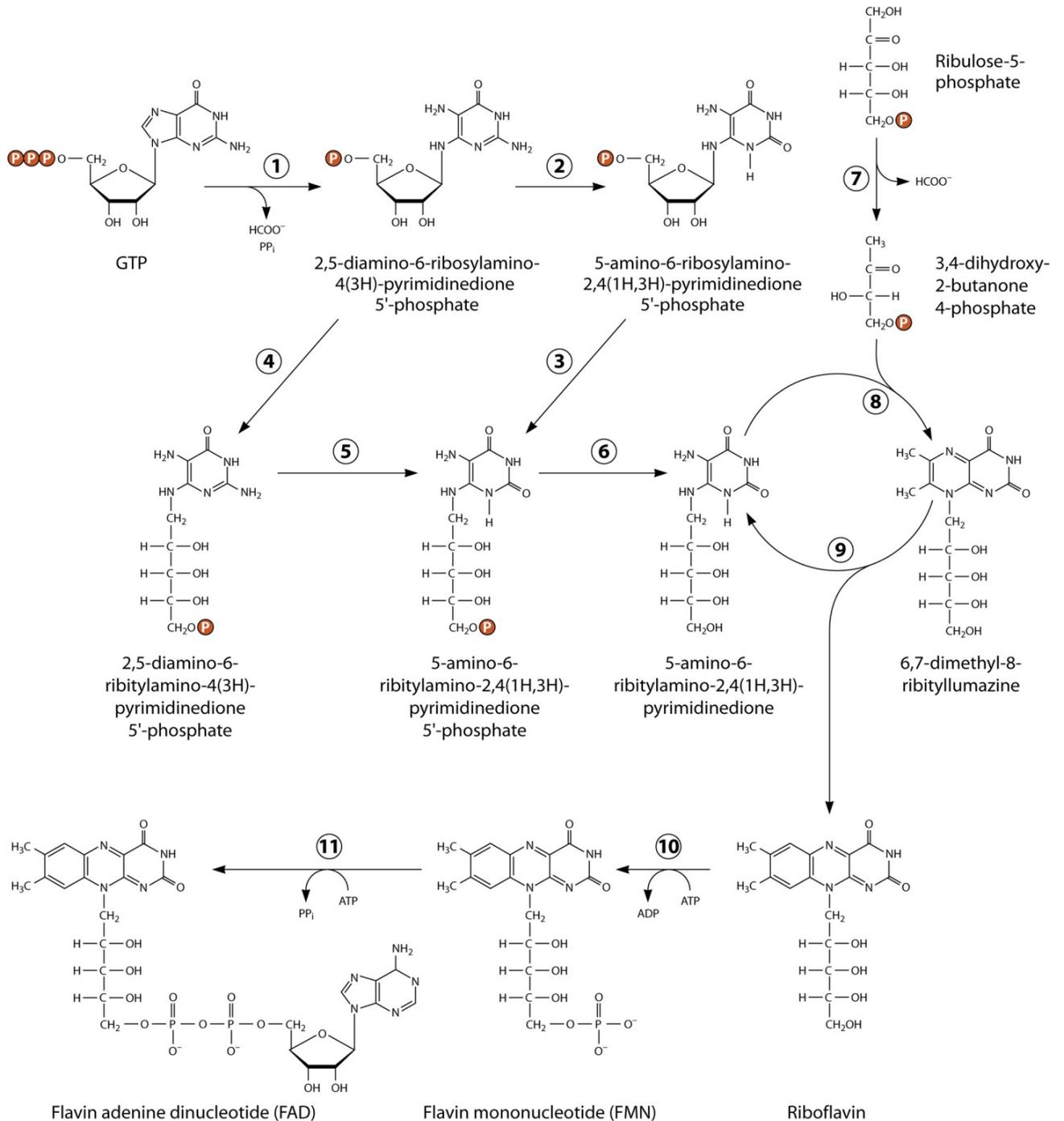


Рисунок 1. Схема биосинтеза рибофлавина и его производных.

пиримидина превращается в 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин путем конденсации с 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатом (рис. 1, реакция 8), который образуется из рибулозо-5-фосфата (рис. 1, реакция 7). На заключительном этапе биосинтеза происходит дисмутация производного птеридина, с образованием рибофлавина и пиримидина (рис. 1, реакция 9).

Ферменты биосинтетического пути, осуществляющие весь цикл превращений, начиная со стартового предшественника гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ), наиболее детально описаны в следующих разделах.

1.1.1. ГТФ-циклогидролаза II

Первая реакция биосинтеза рибофлавина осуществляется ферментом ГТФ-циклогидролазой II (EC 3.5.4.25). Впервые этот фермент был выделен из клеточного экстракта *Escherichia coli*. Позднее было показано, что фермент осуществляет превращение гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ) в 2,5-диамино-6-(рибозиламино)-4(3H)-пиримидинон-5'-фосфат, формиат и неорганический пирофосфат, а также способен из ГТФ образовывать ГМФ, хотя и с более низкой скоростью [122].

ГТФ-циклогидролаза II *E. coli* кодируется геном *ribA* и представляет собой гомодимер, содержащий Zn^{2+} в качестве кофактора на субъединицу [68].

У некоторых бактерий белок с ГТФ-циклогидролазной активностью является бифункциональным. Так, например, фермент, кодируемый геном *ribA* у *Bacillus subtilis*, обладает также и 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазной активностью [62].

Известна трехмерная структура ГТФ-циклогидролазы II. Активный центр формируется тремя цистеиновыми остатками, Cys⁵⁴, Cys⁶⁵ и Cys⁶⁷, которые связаны с ионом Zn^{2+} , а также Arg¹²⁸ и Tyr¹⁰⁵ [68; 117]. На начальном этапе происходит отщепление пирофосфата, причем эта стадия является скоростью-лимитирующей для всей реакции. Далее имидазольное кольцо раскрывается и происходит высвобождение формиата [117].

Стоит отметить, что реакция, катализируемая ГТФ-циклогидролазой II, регулирует скорость биосинтеза рибофлавина в промышленных штаммах продуцентах. Так, дополнительная копия гена *ribA*, содержащая конститутивный промотор, увеличивает выход конечного продукта на 25% [62].

1.1.2. Редуктаза и дезаминаза

Следующими этапами биосинтеза рибофлавина у эубактерий, таких как *E. coli* и *B. subtilis*, является гидролитическое удаление аминогруппы в положении 2 и редукция боковой цепи с образованием 5-амино-6-(рибителиамино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндион-5'-фосфата. Такое последовательное превращение у бактерий катализирует бифункциональный фермент, обладающий дезаминазной и редуктазной активностями. Данный фермент кодируется геном *ribG* у *B. subtilis* и *ribD* у *E. coli*. Домен с дезаминазной активностью (ЕС 3.5.4.26) локализован в С-концевой части белка, а домен с редуктазной активностью (ЕС 1.1.1.193) – в N-концевой части фермента. Для осуществления редуктазной реакции необходимо наличие следующих кофакторов в восстановленной форме: НАД·Н и НАДФ·Н [119].

К настоящему времени с помощью рентгеноструктурного анализа определена пространственная структура этих белков [30; 132]. Полученные структуры ферментов показывают, что функциональные области белка (дезаминаза и редуктаза) являются независимыми, без очевидных каналов, соединяющих два активных сайта [88].

1.1.3. Дефосфорилирование 5-амино-6-(рибителиамино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндион-5'-фосфата

5-Амино-6-(рибителиамино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндион-5'-фосфат образуется после трех стадий биосинтеза рибофлавина и подвергается дальнейшему дефосфорилированию с образованием 5-амино-6-(рибителиамино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндиона. Именно это соединение является субстратом для фермента люмазинсинтазы на следующем этапе биосинтеза [47]. Однако, механизм дефосфорилирования остается неизвестным в настоящее время. Участие неспецифических фосфатаз в биосинтезе рибофлавина маловероятно, поскольку такой фермент действовал бы и на фосфорилированные промежуточные продукты реакций, которые образуются в результате действия ферментов ГТФ-циклогидролазы II, дезаминазы и редуктазы. Можно предположить, что неизвестная фосфатаза

участвует одновременно в биосинтезе рибофлавина и некоторых других соединений, поэтому соответствующие мутанты не могут быть обнаружены среди ауксотрофов только по рибофлавину.

1.1.4. 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза

Впервые 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза была выделена из дрожжевых клеток *C. guilliermondii* и впоследствии охарактеризована [144; 145]. Субстратом для этого фермента (ЕС 4.1.99.12) служит рибулоза-5-фосфат, у которой в ходе реакции происходит перестройка углеродного скелета и теряется С-4 атом. В настоящее время 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфат-синтазы выделены из многих микроорганизмов. Фермент у *E.coli* кодируется геном *ribB* и является гомодимером с молекулярной массой 47 кДа [70; 120]. Фермент у *B. subtilis* (ген *ribA*) обладает двумя каталитическими активностями: N-концевой домен отвечает за 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазную активность, в то время как С-концевой домен характеризуется ГТФ-циклогидролазной активностью.

Структура 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы *E.coli* решена с помощью рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии [70; 83].

1.1.5. Люмазинсинтаза

6,7-Диметил-8-рибитиллюмазинсинтаза или люмазинсинтаза (ЕС 2.5.1.В6) катализирует реакцию конденсации 5-амино-6-(рибитиламино)-2,4(1Н,3Н)-пиримидиндиона с 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатом. Этот фермент впервые был выделен из бактерий *B. subtilis* в составе комплекса с рибофлавинсинтазой, который получил название «тяжелая рибофлавинсинтаза» [11]. Такой ферментный комплекс (рис. 2) имеет массу около 1 МДа и состоит из 3-х α -субъединиц (рибофлавинсинтаза) и 60 β -субъединиц (люмазинсинтаза).

Люмазинсинтаза кодируется геном *ribH* у *B. subtilis*, геном *ribE* у *E. coli*. Фермент состоит из 60 одинаковых субъединиц (β), которые в пространстве образуют сферический капсид с икосаэдрической точечной группой

симметрии 532. Внутри такого капсида может располагаться трехзвенный рибофлавинсинтазный модуль (рис.2) [77; 101].

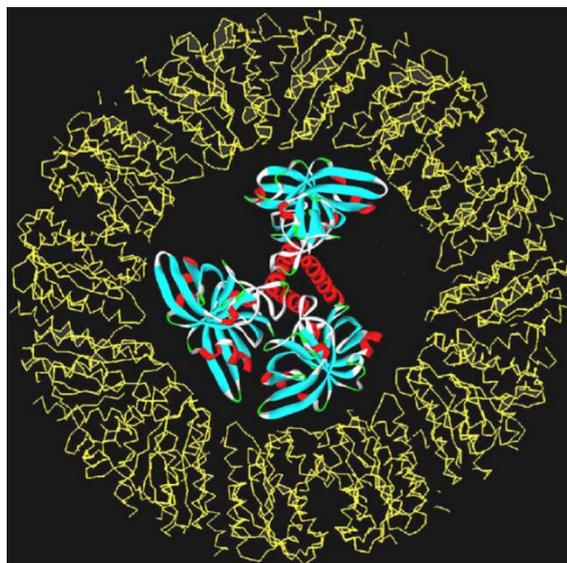


Рисунок 2. Компьютерная модель «тяжелой рибофлавинсинтазы».

1.1.6. Рибофлавинсинтаза

Заключительный этап в биосинтезе рибофлавина осуществляется ферментом рибофлавинсинтазой (ЕС 2.5.1.9). Эту реакцию можно охарактеризовать как дисмутацию, в результате которой происходит передача 4-х углеродного фрагмента между двумя одинаковыми молекулами субстрата – 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина. Одна молекула выступает в качестве донора 4-х углеродного фрагмента, который используется для преобразования птеридинового кольца субстрата в изоаллоксазиновое кольцо рибофлавина. Второй продукт реакции дисмутации – 5-амино-6-рибителиамино-2,4(1Н,3Н)-пиримидинон, является субстратом для предшествующей стадии синтеза рибофлавина, катализируемое ферментом люмазинсинтазой [48].

Впервые фермент с рибофлавинсинтазной активностью был обнаружен в клеточном экстракте флавинсинтезирующих аскомицетов. Позднее, были

детально изучены свойства и пространственная структура ферментов, выделенных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, эубактерий *E. coli* и *B. subtilis* [40; 65; 84; 95]. Упомянутые выше ферменты являются гомотримерами. Гомотример рибофлавинсинтазы представляет собой асимметричную группу трех мономеров (А, В и С), каждый из которых состоит из двух β -баррелей (N-концевой баррель и С-концевой баррель) с практически одинаковой топологией, и С-концевой α -спирали. Структуры трех мономеров в составе тримера похожи, но не являются идентичными. Три активных сайта располагаются в пространстве между парами мономеров. Такая конфигурация рибофлавинсинтазы предполагает, что только один сайт может быть каталитически активным в ходе ферментативной реакции [84].

Рибофлавинсинтаза у *E. coli* кодируется геном *ribC*, у *B. subtilis* – геном *ribB*.

Следует отметить, что очень сложная рибофлавинсинтазная реакция происходит спонтанно и не требует присутствия катализатора. Тогда как неферментативное превращение 2-х молекул 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина в рибофлавин и 5-амино-6-рибителиамино-2,4(1Н, 3Н)-пиримидиндион требует длительного кипячения водного раствора с кислой или нейтральной реакцией рН[1].

1.1.7. Биосинтез флавиновых нуклеотидов, ФМН и ФАД

В отличие от биосинтеза рибофлавина *de novo*, который происходит только в растениях, грибах и большей части прокариотов, все организмы, включая животных, способны синтезировать из рибофлавина ФМН и ФАД, входящие в состав флавопротеинов.

ФМН образуется в результате специфического фосфорилирования рибофлавина, которое катализируется рибофлавинкиназой (ЕС 2.7.1.26)(рис.1, реакция 10). Синтез ФАД осуществляет ФАД-синтаза или ФМН-аденилилтрансфераза (ЕС 2.7.7.2.), которая катализирует перенос аденилильной группы от АТФ к ФМН (рис.1, реакция 11).

За последние 50 лет исследований, ферменты с рибофлавинкиназной и ФАД-синтазной активностями обнаружены у многих видов. Известно, что животные, растения, грибы и археи облают монофункциональными ферментами, тогда как у бактерий обнаружены бифункциональные ферменты, катализирующие последовательное превращение рибофлавина в ФМН, а затем ФМН в ФАД. Так, бифункциональная рибофлавинкиназа/ФАД-синтаза у бактерий *B. subtilis* кодируется геном *ribC*, у *E. coli* - геном *ribF*. Следует отметить, что реакция образования ФАД является обратимой, поскольку было показано, что бифункциональный фермент может из ФАД и пирогосфата вновь образовывать ФМН и АТР [43].

У бактерий *B. subtilis* обнаружен также фермент с альтернативной киназной активностью, который кодируется геном *ribR* – монофункциональная рибофлавинсинтаза. Вероятно, этот белок обладает дополнительной функцией в клетке. Было показано, что N-концевой домен отвечает за флавокиназную активность, тогда как С-концевая часть белка способна связываться с лидерной областью мРНК рибофлавинового оперона[59].

В настоящее время с помощью рентгенографии определены структуры рибофлавинкиназ *S.pombe* и *Homo sapiens*, и ФАД-синтазы *Thermogota maritima*[15; 69; 147].

1.2. Гены биосинтеза рибофлавина и его производных

Наиболее хорошо изучена система флавиногенеза у *B.subtilis*. Она представлена рибофлавиновым опероном, который контролирует весь путь образования рибофлавина начиная со стартового предшественника - гуанозин-5'-3-фосфата, а также несцепленными с опероном геном бифункциональной флавокиназы/ФАД-синтазы – *ribC*, обеспечивающим последовательное образование ФМН из рибофлавина и ФАД из ФМН [3; 87], и геном монофункциональной флавокиназы – *ribR*, контролирующим синтез ФМН [131].

В структурном отношении *rib*-оперон *ribGBAHT B. subtilis* состоит из 5 неперекрывающихся генов и содержит три регуляторных элемента – расположенная перед первым структурным геном оперона регуляторная зона *ribO*, в состав которой входит основной промотор P1, 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 люомазинсинтазы *ribH* [109]. Схема оперона представлена на рисунке 3.

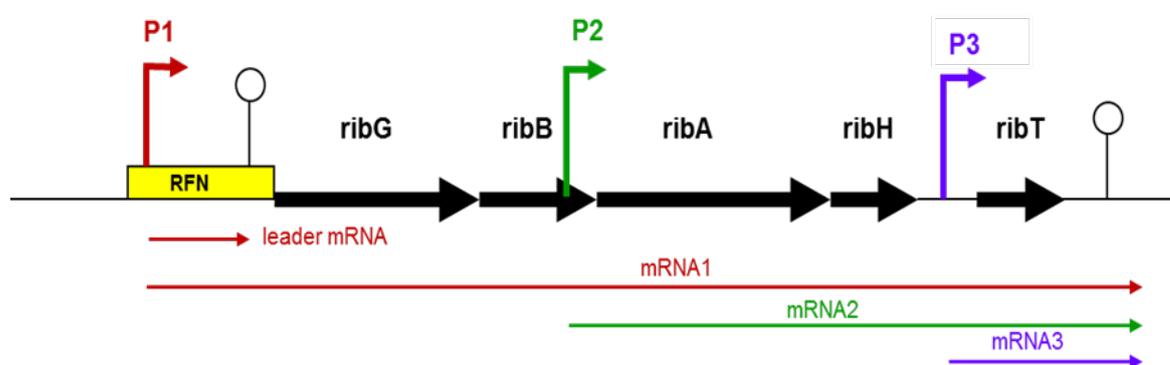


Рисунок 3. Структура рибофлавинового оперона *B. subtilis*.

Основной промотор *rib*-оперона P1 TTGCGT-17 п.н.-TATAAT был однозначно идентифицирован методом S1-картирования [100]. В случае промотора P1 имеет место регуляция транскрипции путем непосредственного взаимодействия флавинов с консервативным участком лидерной мРНК (*rfn*-элементом), в результате чего меняется ее вторичная структура и модулируется экспрессия оперона за счет изменения вероятности образования терминирующей шпильки [99]. Такие некодирующие мРНК, способные напрямую распознавать и связывать метаболиты без белковых посредников для регуляции экспрессии прилегающих генов, получили название рибопереключателей [6; 23]. Более подробно о механизме действия рибопереключателей будет рассказано в следующей главе. Что касается структуры и функциональной значимости внутренних промоторов P2 и P3, то до настоящего времени этот вопрос остается открытым.

Рибофлавиновые опероны также были изучены у *Bacillus amyloliquefaciens*[2], *Actinobacillus pleuropneumoniae*[50] и у вида *Bartonella*[16]. У *Photobacterium phosphoreum* и *Photobacterium leiognathi*, гены биосинтеза рибофлавина расположены в *lux*-опероне [79; 85], тогда как у *Vibrio fisheri* ген, кодирующий фермент пиримидин дезаминазу/редуктазу расположен конвергентно к *lux*-оперону[80].

В отличие от этих геномов, гены биосинтеза рибофлавина у *E. coli* не сгруппированы в единый оперон, а разбросаны на хромосоме в четырех или пяти несцепленных локусах. В настоящее время известны нуклеотидные последовательности и положение на генетической карте всех шести генов *E. coli*, вовлеченных в биосинтез рибофлавина.

Исторически сложилось так, что названия *rib*-генов у *E. coli* и *B. subtilis* различаются (рис. 4). Так, бифункциональный фермент пиримидин дезаминаза/редуктаза RibG и α -субъединица рибофлавинсинтазы RibB *B. subtilis* имеют свои аналоги у *E. coli* под названием RibD и RibE соответственно. Кроме того, у *E. coli* разные гены *ribB* и *ribA* кодируют 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу и ГТФ-циклогидролазу II соответственно, тогда как у *B. subtilis* эти функции выполняет один фермент, кодируемый геном *ribA*.

О регуляции экспрессии генов биосинтеза рибофлавина у *E. coli* известно не так много. В работе [74] сообщалось, что ген *ribA*, контролирующий синтез первого фермента биосинтетического пути – ГТФ-циклогидролазы II, находится под позитивным контролем продукта гена *soxS*, и его экспрессия повышается в условиях оксидативного стресса.

Любопытно отметить, что регуляция экспрессии лишь одного гена *E. coli* – *ribB* осуществляется с помощью упомянутого выше ФМН-зависимого рибопереключател. В 5'-некодирующей области мРНК этого гена был обнаружен упомянутый выше консервативный участок - *rfn*-элемент, который способен связываться с ФМН. В результате такого взаимодействия стабилизируется конфигурация мРНК, препятствующая

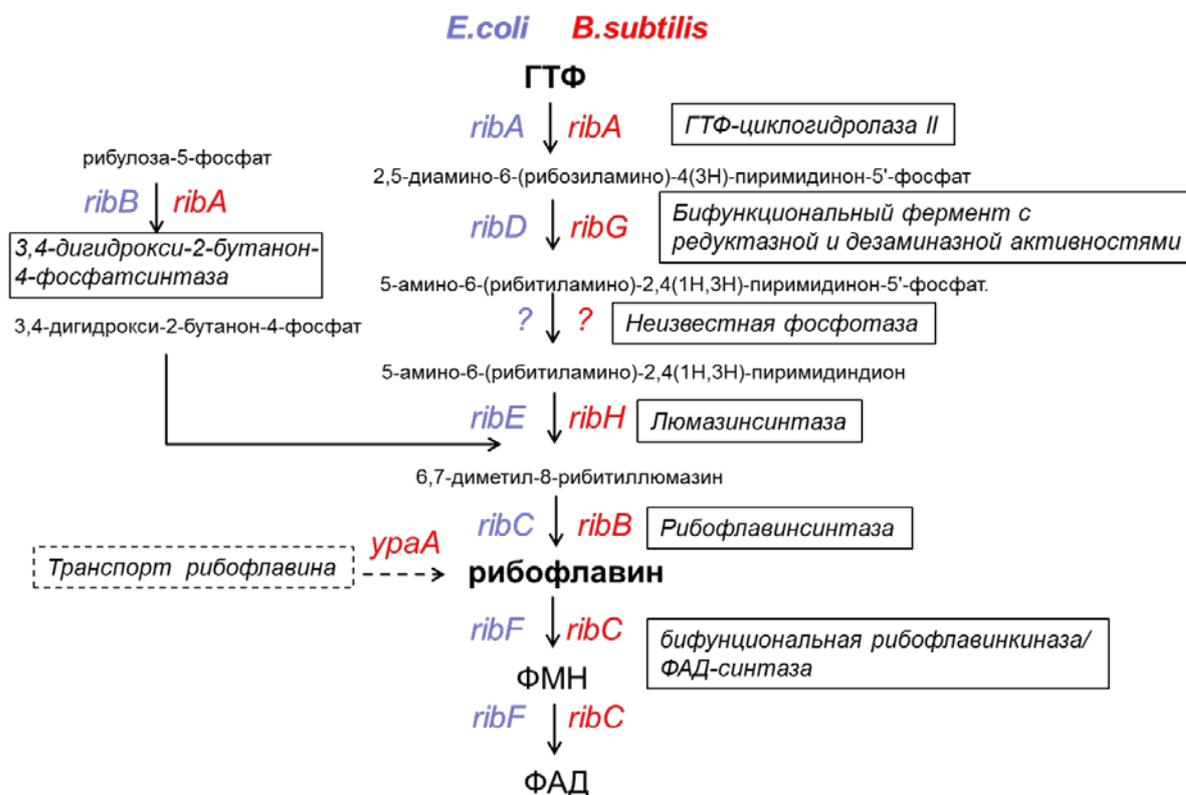


Рисунок 4. Пути биосинтеза рибофлавина и его производных у *E. coli* и *B. subtilis*

трансляции гена из-за формирования шпилечной структуры секвестра, блокирующего сайт связывания рибосомы (SD)[4].

Гены *ribC* и *ribR*, продукты которых осуществляют превращение рибофлавина в ФМН, а затем в ФАД, у *B. subtilis* входят в состав биохимически гетерогенных оперонов [8].

Из данных о строении хромосомы *B. subtilis* следует, что ген *ribC* входит в оперноподобную структуру с генами *truB* (ген псевдоуридин-55-синтазы) и *rpsO* (ген рибосомного белка S15) [76]. Ген *ribC* транскрибируется в виде полицистронной мРНК с основного промотора оперона *truB-rpsO*, а также со своего собственного промотора, расположенного в дистальной области гена *truB*[8].

Ген *ribR* является частью оперона *ytmI-ytmM*, состоящего из 12 структурных генов и примыкающей к ним регуляторной зоны длиной 153

нуклеотида, где в противоположном по отношению к структурным генам оперона направлении транскрибируется транскрипционный активатор *ytII*. В работе [32] было показано, что экспрессия генов этого оперона индуцируется при добавлении в среду глутатиона, таурина и метионина. Ген *ribR* не имеет собственного промотора и его активность определяется опероном *ytmI-ytnM*[130]. Было также высказано предположение, что продукт гена *RibR* может выполнять несколько функций в клетке. Так, в работе [59] было установлено, что N-концевой домен этого белка обладает флавокиназной активностью, тогда как С-концевой домен способен связываться с лидерной областью мРНК рибофлавинового оперона.

2. Регуляция экспрессии генов посредством рибопереключателей у бактерий

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. Так, ДНК-связывающие регуляторные белки, которые оказывают влияние на взаимодействие РНК-полимеразы с промоторной областью, регулируют экспрессию генов на уровне инициации транскрипции. РНК-связывающие белковые регуляторы взаимодействуют с РНК-транскриптом и осуществляют контроль на уровне терминации транскрипции, инициации трансляции, а также влияют на стабильность мРНК. Однако в последнее время наши представления о механизмах регуляции экспрессии генов существенно расширились и дополнились. Так, появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что молекулы РНК обладают широким спектром регуляторных функций и, как следствие, участвуют в контроле клеточного метаболизма у бактерий [148].

К одним из представителей таких РНК-регуляторов относят класс рибопереключателей (или сенсорных РНК, “riboswitches”). Рибопереключатели являются цис-действующими регуляторными элементами, поскольку расположены, как правило, в 5'-лидерных не кодирующих областях мРНК генов, экспрессию которых они модулируют. Важным свойством рибопереключателей является способность напрямую, без помощи белковых посредников, распознавать и связывать определенные клеточные метаболиты. В результате связывания с метаболитом происходит «переключение» между альтернативными конфигурациями мРНК и, таким образом, осуществляется контроль транскрипции либо трансляции

соответствующих мРНК, которые обычно кодируют белки, участвующие в биогенезе или транспорте этих метаболитов.

Первые рибопереключателы были идентифицированы в бактериях 12 лет назад как природные сенсоры фосфорилированных производных рибофлавина и тиаминa [99; 154]. В настоящее время охарактеризовано более двадцати различных типов рибопереключателы, причем представители этого класса РНК-регуляторов обнаружены не только в бактериях, но и в археях, растениях, грибах и водорослях.

2.1. Разнообразие рибопереключателы у бактерий

В основе деления рибопереключателы на специфические классы лежит свойство аптамерного домена рибопереключателы связывать определенный метаболит (Таблица 1). Аптамерный домен, формирующий метаболит-связывающий карман, характеризуется высокой степенью гомологии нуклеотидных последовательностей, а также сходством пространственных структур для рибопереключателы, узнающих определенный лиганд, среди бактерий различных таксономических групп.

Таблица 1

Лиганды рибопереключателы*				
Коэнзимы	Производные нуклеотидов	Аминокислоты	Сахара	Ионы
AdoCbl	Гуанин	Глицин	Gln6P	Mg ²⁺
TPP	Аденин	Лизин	(Глюкозамин-6 фосфат)	F ⁻
FMN	PreQ ₁	Глутамин		
SAM	2`-dG			
SAH	c-di-GMP			
Moco				
Wco				

* Gln6P - глюкозамин-6-фосфат; 2`-dG , 2'-дезоксигуанозин; preQ₁ - предшественнику квеуозина; Moco, Wco – молибденовый и вольфрамовый кофакторы, соответственно; SAH – S- аденозил-L-гомоцистеин; c-di-GMP, циклический ди-гуанозинмонофосфат.

Следующие классы рибопереключателей имеют наибольшее количество представителей среди различных бактерий: группа рибопереключателей, связывающих производные витаминов В12, В1, В2, а именно аденозинкобаламин (AdoCbl) [104], тиаминпирофосфат (ТРР)[99; 154], флавинмононуклеотид (FMN) [99; 155] соответственно; рибопереключатели, связывающие аминокислоты лизин [54; 137] и глицин[91]; S-аденозинкобаламин-[46; 94; 157], гуанин/аденин-связывающие рибопереключатели [89; 90]; и рибопереключатели, связывающие бактериальный вторичный мессенджер циклический ди-гуанозинмонофосфат[136].

В отдельную группу выделяют, так называемые, «сиротские» рибопереключатели, для которых не удалось установить связывающий лиганд. К этой группе относят *yubP/ykoK* мотив РНК, который часто ассоциирован с генами, продукты которых вовлечены в стрессовый ответ на изменение рН внутри клетки; *ydaO/yuaA* мотив РНК ассоциирован с генами, продукты которых участвуют в ответе на осмотический стресс; *pfl* мотив РНК контролирует экспрессию генов метаболизма фолатов, *ykkC/ykkD* мотив РНК участвует в регуляции экспрессии генов метаболизма и транспорта пуринов [17; 97].

Некоторые рибопереключатели узнают неорганические лиганды, такие как катионы магния [35; 37], а также отрицательно заряженные ионы фтора[12].

Следует также отметить, что существуют рибопереключатели, которые распознают один и тот же метаболит, но при этом их пространственные конфигурации не имеют, практически, ничего общего. Представителями такой группы рибопереключателей является два класса с-di-GMP-I и с-di-GMP-II, связывающие бактериальный вторичный мессенджер [81; 136] (рис. 5А), а также набор рибопереключателей, связывающих SAM и его производное S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) (рис 5Б). Последняя группа рибопереключателей включает наиболее обширный класс SAM-I [46; 94; 157]

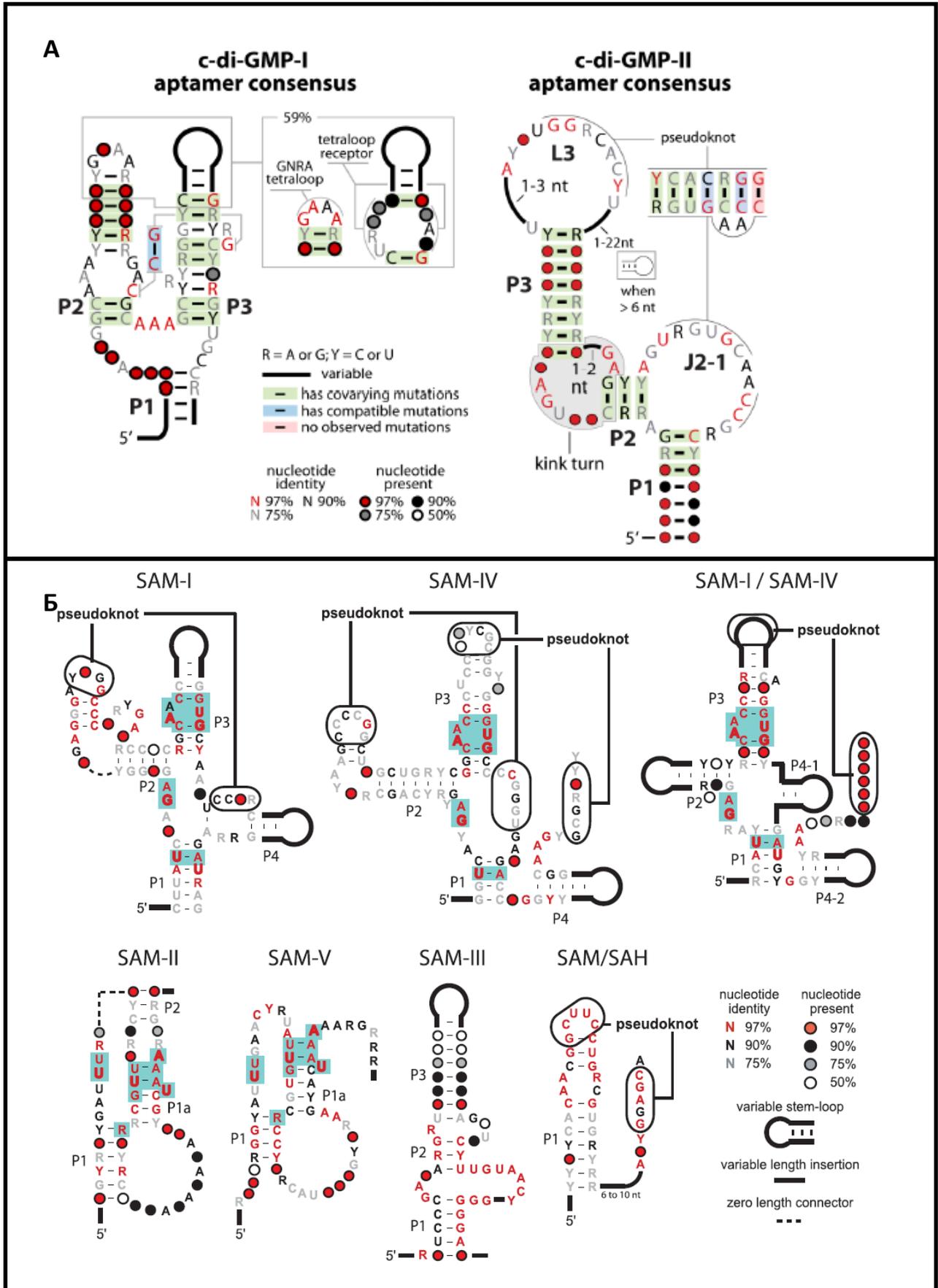


Рисунок 5. (А). Сравнение нуклеотидных последовательностей и структурных моделей для аптамеров класса I (слева) и класса II (справа) c-di-GMP-связывающих рибопереключателей. **(Б).** Аптамеры различных классов рибопереключателей, узнающих SAM и/или SAH.

и его близкие варианты SAM-IV [149] и SAM-I/IV [150], более редкие SAM-II [33] и SAM-V классы [114], SAM-III или S_{MK} класс [49] и, наконец, крайне редкий класс SAM/SAH [150].

Среди известных рибопереключателей можно обнаружить и прямо противоположную ситуацию, когда и нуклеотидная последовательность и структура лиганд-связывающего кармана похожи, тогда как лиганды представляют собой разные соединения. Например, пространственная конфигурация аптамеров пурин-связывающих рибопереключателей формируется в результате соединения трех шпилечных структур, две из которых P2 и P3 взаимодействуют между собой своими петлевыми участками (рис. 2) [14; 128]. В качестве лигандов для аптамеров такой архитектуры могут выступать гуанин [89], аденин [90] или 2'-дезоксигуанозин [73]. Избирательность связывания в данном случае обусловлена нуклеотидами, расположенными в области соединения стеблей шпилечных структур (J1-2, J2-3, и J3-1). Так, для изменения специфичности аптамера с аденина на гуанин требуется всего одна нуклеотидная замена с U74 на C74 [90], а для распознавания 2'-дезоксигуанозина необходимо ввести несколько точечных мутаций в области соединения J2-3 [41] (рис.6)

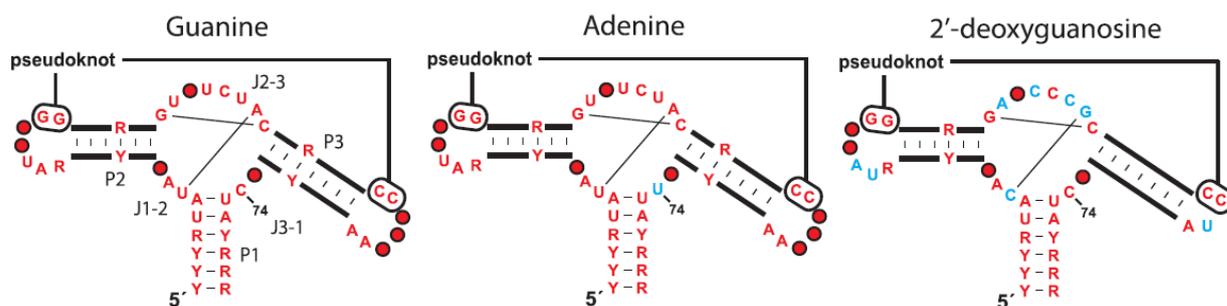


Рисунок 6. Сопоставление нуклеотидных последовательностей и структуры аптамеров пуриновых рибопереключателей и специфичность их связывания. Нуклеотиды, выделенные красным являются консервативными более чем на 90% для представителей класса гуанин-связывающих рибопереключателей. Голубым цветом показаны нуклеотиды, которые отличаются от аптамера, распознающего гуанин.

К настоящему времени охарактеризованы наиболее распространенные классы рибопереключателей, поскольку вероятность их обнаружения в геномах бактерий методами биоинформатики для исследователей

существенно выше. С помощью сравнения нуклеотидных последовательностей в геномах бактерий различных таксономических групп, обнаруживают консервативные последовательности в некодирующих областях. Далее потенциальные кандидаты на новый рибопереключателъ подвергают дальнейшему анализу на предмет образования альтернативных вторичных структур в граничащей с 3'-конца последовательности некодирующей мРНК. Поиск специфических лигандов для потенциальных рибопереключателъ может проводиться исходя из функций продуктов генов, ассоциированных с рибопереключателем, однако если функции белковых продуктов прилегающих генов не установлены, данная стратегия поиска будет несостоятельной. Следовательно, на основе методической базы, которой владеют исследователи в настоящее время, обнаружение новых классов рибопереключателъ, которые имеют небольшое число представителей, является достаточно сложной задачей.

2.2. Аналоги лигандов рибопереключателъ как антимикробные соединения

После первых исследований по идентификации рибопереключателъ, стало очевидно, что эти РНК могут быть привлекательными объектами для поиска антибиотиков[19; 21; 38]. Во-первых, многие рибопереключателъ подавляют экспрессию генов, белковые продукты которых участвуют в транспорте или биосинтезе необходимых метаболитов. Таким образом, соединения, которые связываются с рибопереключателем, имитируя природный лиганд, могут подавлять рост бактерий, лишая клетки жизненно важных метаболитов. Во-вторых, природный лиганд может служить базовым соединением для химической модификации с целью получения новых антибиотиков. В связи с этим, рибопереключателъ являются уникальными регуляторными элементами среди некодирующих РНК, поскольку они способны связывать малые молекулы, структуру которых можно менять.

Одним из первых свидетельств того, что регуляторная активность рибопереключателей может подавляться аналогами их лигандов, было связано с тем фактом, что резистентность бактерий к токсическому аналогу лизина аминоксилцистеину (АЕС) может быть достигнута посредством введения мутаций в лизин-связывающий рибопереключателе [137]. Устойчивость к ингибирующему действию аналога тиамин (пиритиамин) также может приобретаться в результате мутаций в ГРР-связывающем рибопереключателе у различных грибов и бактерий [75; 134]. Поскольку такие соединения как АЕС и пиритиамин являются очень близкими по своей структуре к лизину и тиамину соответственно, связывание этих соединений с аптамерными доменами рибопереключателей, скорее всего, будет приводить к замедлению бактериального роста. Стоит отметить, что АЕС также распознается аминоксил-тРНК-синтазой, и поэтому может вызвать значительные неприятности в результате встраивания в белки [10].

Более того, в природе также есть примеры использования аналогов лиганда для подавления активности рибопереключателей. Розеофлавин, который является близким аналогом рибофлавина, был выделен из вида *Streptomyces*, а позже было показано, что это соединение обладает антимикробным эффектом. В настоящее время известно, что розеофлавин может связываться ФМН-зависимыми рибопереключателями [92; 108; 127], и устойчивость к данному соединению (или, скорее всего, к его фосфорилированному производному) приобретается в результате мутации лиганд-связывающего домена [80]. Учитывая химическое сходство между розеофлавинфосфатом и ФМН, возможно, что это соединение может не только подавлять биосинтез рибофлавина, и как следствие, ФМН, но также включаться в ферменты, которые используют ФМН как кофактор.

В настоящее время опубликованы пространственные структуры аптамеров различных классов рибопереключателей [42; 126], что способствует более эффективному поиску соединений, проявляющих антимикробную активность. Так, основываясь на данных

рентгеноструктурного анализа аптамерного домена гуанин-зависимого рибопереключателю, было получено несколько пуриновых аналогов, способных связываться с РНК [36; 72; 102]. Некоторые из них подавляли рост бактерий, предположительно, супрессируя синтез белков, вовлеченных в рециркуляции и биосинтез пуринов *de novo*.

Кроме того, для обнаружения новых лигандов используются и другие стратегии поиска, например, такие как высоко пропускной скрининг [18; 93]. Такой подход должен непременно привести к получению новых химических соединений, которые способны подавлять регуляцию генов, осуществляемую рибопереключателю.

2.3. Механизмы действия рибопереключателю

Аптамерный домен рибопереключателю, как отмечалось ранее, выступает в качестве сенсора определенных метаболитов. В момент достижения пороговой концентрации лиганда происходит связывание с аптамерным доменом, что в свою очередь индуцирует структурную реорганизацию лидерной мРНК, приводящую к изменению фолдинга и функции прилегающей экспрессионной платформы. Экспрессионная платформа – это переменный домен рибопереключателю, который использует различные механизмы для регуляции экспрессии генов. Рибопереключателю, действующие на уровне транскрипции, изменяют вероятность формирования Rho-независимого терминатора транскрипции, т.е. шпильчатой структуры в РНК (обычно G/C-богатой), за которой следует полиуридиловая последовательность (рис. 7А) [55]. Большинство рибопереключателю действуют по принципу негативной регуляции, т.е. в результате связывания с лигандом стабилизируется такая конфигурация лидерной мРНК, в результате которой образуется Rho-независимый терминатор, вызывающий преждевременную терминацию транскрипции прилегающих генов [6; 13]. Однако, некоторые представители глицин- [91], аденин-[90] и лизин-[124; 137] связывающих рибопереключателю

активируют экспрессию генов в ответ на связывание с метаболитом (позитивная регуляция). В данном случае стабилизируется структура антитерминатора, позволяющая дальнейшую транскрипцию в область структурных генов. Подобный механизм регуляции, основанный на изменении конфигурации мРНК, влияющей на формирование двух взаимоисключающих структур терминатора/антитерминатора, широко используется в бактериях и получил название аттенюации транскрипции [158]. Так, формирование альтернативных структур в РНК в случае аттенюации транскрипции может определяться также транслирующей рибосомой, регуляторными белками, тРНК [9].

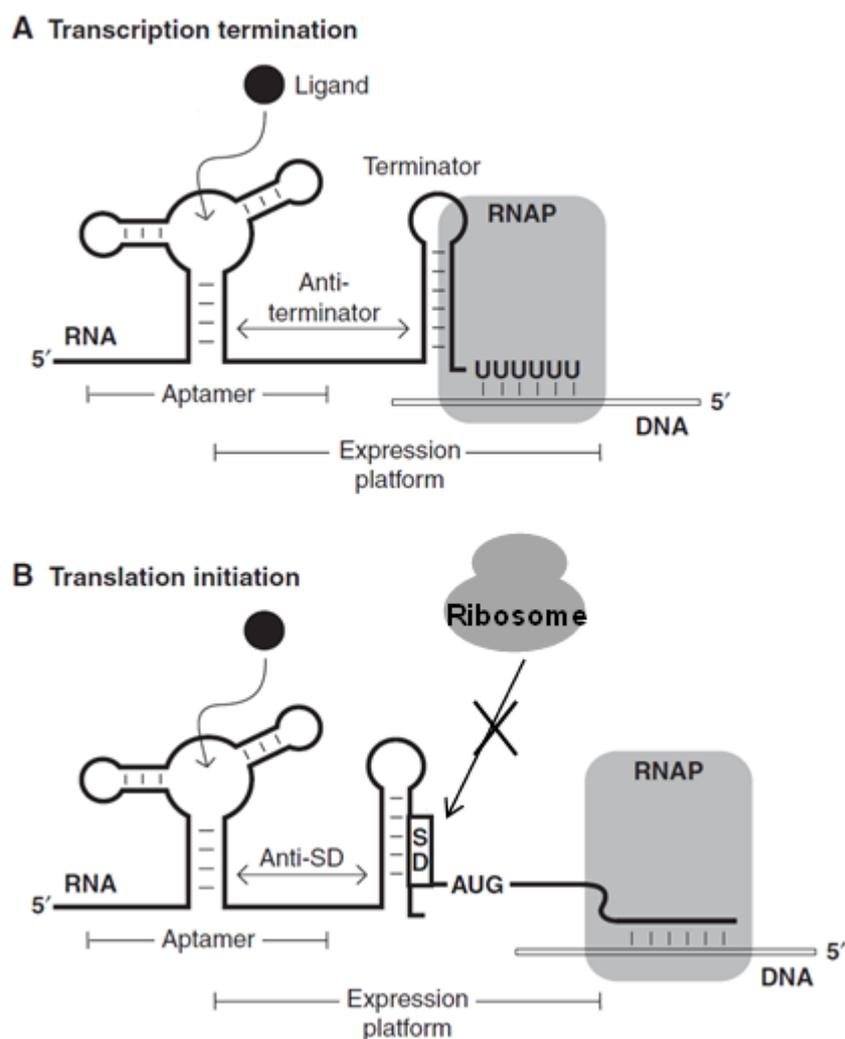


Рисунок 7. Основные механизмы регуляции экспрессии генов с участием рибопереклюателей у бактерий: (А) регуляция транскрипции (Б) регуляция трансляции.

Регуляция трансляции бактериальных генов с участием рибопереключателей, как правило, происходит на стадии инициации (рис. 7Б). В этом случае, экспрессионная платформа рибопереключатателя содержит шпилечную структуру РНК, в формировании стебля которой принимает участие последовательность Шайна-Дальгарно (SD). Такая шпилька называется секвестром, поскольку она препятствует связыванию рибосомы с мРНК и, как следствие, эффективной трансляции структурных генов. Наиболее часто, связывание лиганда с рибопереключателем, действующем на уровне инициации трансляции, сопровождается формированием секвестра (негативная регуляция). А в случае позитивной регуляции, наоборот, взаимодействие аптамерного домена с лигандом стабилизирует структуру антисеквестра в экспрессионной платформе, и в результате SD-последовательность оказывается в одноцепочечной конфигурации, что повышает эффективность ее связывания с рибосомой. Примером активации трансляции в результате взаимодействия аптамера со своим лигандом является адениновый рибопереключател, расположенный в лидерной области гена *add* *Vibrio vulnificus*. Связывание аденина с А-боксом рибопереключатателя приводит к высвобождению нуклеотидных последовательностей сайта связывания рибосомы и стартового кодона, которые участвуют в формировании стебля шпильки, блокирующей трансляцию, в отсутствие аденина [128].

Необычный механизм регуляции используется в случае GlcN6P-рибопереключатателя, расположенного в некодирующей области *glmS* генов у грамположительных бактерий. Представители данного класса рибопереключателей обладают свойствами рибозимов, т.е. проявляют ферментативную активность. Глюкозамин-6-фосфат выступает не только в качестве лиганда, но и является кофактором, ускоряющим процесс расщепления мРНК недалеко от 5'-конца в случае связывания с аптамером [156]. Далее продукт расщепления лидерной мРНК подвергается дальнейшей

деградации с участием РНКазы J, что приводит к подавлению трансляции кодирующей части мРНК [31].

Деградация мРНК транскрипта с участием РНКаз используется также рибопереклочателями, не проявляющими рибозимной активности. Примером такой регуляции является лизиновый рибопереклочатель, расположенный в лидерной области гена *lysC* *E.coli* [28]. В ответ на связывание с лизином, лидерная мРНК гена *lysC* принимает такую конфигурацию, которая приводит не только к подавлению инициации трансляции из-за формирования шпильки секвестра, но и становятся доступными сайты узнавания для РНКазы E. В отсутствие лизина, рибопереклочатель принимает альтернативную конфигурацию, которая способствует трансляции и, в тоже время, блокирует сайты узнавания РНКазы E.

Как отмечалось выше, рибопереклочатели относят к *cis*-действующим регуляторным элементам, поскольку они модулируют экспрессию прилегающих генов. Однако в последнее время появляются данные, указывающие на то, что рибопереклочатели могут действовать и в транс-положении. Примером такой регуляции является SAM-связывающий рибопереклочатель у *Listeria monocytogenes* [86]. После SAM-опосредованной терминации транскрипции, малые некодирующие РНК SreA и SreB способны связываться с 5'-не кодирующей областью мРНК фактора вирулентности PrfA и подавляют его экспрессию, главным образом, на уровне трансляции. Также у листерий обнаружено, что витамин B₁₂-связывающий рибопереклочатель, который является частью некодирующей антисмысловой РНК *asrocR* и располагается в проксимальной части по отношению к гену *rocR*, регулирует его экспрессию в транс-положении [96]. Так, в присутствии B₁₂ происходит преждевременная терминация транскрипции *asrocR*, в результате которой образуется короткий транскрипт, не оказывающий регуляторного действия на экспрессию гена *rocR*. Напротив, в отсутствие B₁₂, *asrocR* транскрибируется как полноразмерная

антисмысловая РНК, которая взаимодействует с мРНК гена *rocR* и подавляет его экспрессию.

У эукариот разобщение транскрипции с трансляцией и наличие интронов вынуждает использовать альтернативные способы для регуляции генной экспрессии с участием рибопереключателей. Вместо контроля на уровне транскрипции и/или трансляции, эукариотические рибопереключатели, связывающие тиаминпирофосфат (ТРР), регулируют экспрессию генов посредством альтернативного сплайсинга – процесса, в ходе которого интроны вырезаются, а экзоны соединяются между собой в различных комбинациях для получения зрелых мРНК. В результате альтернативного сплайсинга зрелые мРНК могут содержать внутренние стоп-кодоны, которые либо приводят к трансляции «неправильных» пептидов (мицелиальные грибы)[29] либо вызывают преждевременное завершение трансляции (зеленые водоросли)[34]. У высших растений альтернативный сплайсинг приводит к формированию мРНК с длинными 3'-не кодирующими участками, что приводит к дестабилизации таких транскриптов [20; 146].

2.3.1. Роль Rho-фактора в регуляции экспрессии генов с участием рибопереключателей

У бактерий один из основных механизмов терминации транскрипции генов требует присутствия специфического белкового фактора, известного как Rho-фактор. Rho-фактор представляет собой гомогексамерный тороидальный белковый комплекс [129], который ассоциирован с РНК-полимеразой в процессе транскрипции [45]. Действие Rho-фактора состоит в том, что он способен связываться с синтезируемой цепью РНК и далее, используя энергию гидролиза АТФ, пропускать РНК через центральный канал в направлении 5' - 3' [113]. Участки РНК, обычно длиной не менее 80 нуклеотидов, которые распознаются и связываются Rho-фактором получили название *rut*-сайтов (Rho utilization site). *Rut*-сайты не имеют строго

определенной нуклеотидной последовательности и характеризуются повышенным содержанием цитидиновых остатков и неразвитой вторичной структурой [56]. Для того чтобы произошла Rho-зависимая терминация, Rho-фактору необходимо протягивать РНК через центральный канал быстрее, чем скорость, с которой РНК-полимераза удлиняет цепь РНК в процессе транскрипции. Поэтому сайты Rho-зависимой терминации часто совпадают с сайтами пауз РНК-полимеразы[67].

Rho-зависимая терминация транскрипции выполняет различные функции в бактериальной клетке. Помимо формирования 3'-конца полноразмерных мРНК транскриптов, действием Rho-фактора объясняется полярный эффект [118], при котором нонсенс-мутация в проксимальном гене оперона препятствует транскрипции дистальных генов. Остановка рибосом на стоп-кодоне, приводит к тому, что *rut*-сайты, разбросанные на мРНК, становятся доступными для связывания Rho-фактором, что приводит к терминации транскрипции последующих генов.

Недавно было обнаружено, что Rho-фактор подавляет экспрессию генов профагов и других инсерций чужеродных ДНК в бактериальный геном, приобретенных в результате горизонтального переноса у *E. coli*. Так, удаление профага *rac* из штамма *E. coli* дикого типа повышало устойчивость бактерий к антибиотику бицикломицину, ингибирующего действие Rho-фактора[27]. Таким образом, Rho-зависимая терминация выполняет функции природного «иммунитета», который защищает бактериальные клетки от токсического действия чужеродных генов.

Результаты геномного анализа бактерий *E. coli* выявили еще одну функцию Rho-фактора, которая заключается в подавлении транскрипции антисмысловых РНК[111; 112]. Как правило, антисмысловые РНК не кодируют белки и, следовательно, не транслируются, что позволяет Rho-фактору связываться с ними и подавлять дальнейшую транскрипцию. Стоит отметить, что Rho-фактор выполняет эту функцию совместно с NusG и

гистон-подобным белком H-NS, сайт связывания которого на ДНК-матрице располагается вблизи сайта Rho-зависимой терминации [111].

Методом иммунопреципитации хроматина и микроэрей анализа (Chip-chip) было показано, что у *E.coli* Rho-зависимая терминация приводит к образованию малых РНК [112]. Так, малая РНК SroG соответствует лидерной области гена *ribB*, кодирующего один из ферментов биосинтеза рибофлавина, и ранее была идентифицирована в работе [142]. Такая малая РНК содержит последовательность аптамерного домена ФМН-связывающего рибопереклювателя, получившего название *rfn*-элемента. Известно, что регуляция экспрессии гена *ribB* осуществляется ФМН-зависимым рибопереклювателем на уровне инициации трансляции, т.е. в результате связывания лидерной мРНК с ФМН формируется шпильчатая структура секвестра, блокирующего SD-последовательность для связывания с рибосомой [4]. Таким образом, было высказано предположение, что Rho-фактор может играть второстепенную роль в регуляции экспрессии генов с участием рибопереклювателей, контролирующих инициацию трансляции прилегающих генов [22]. Согласно такой гипотезе, образование малой РНК SroG происходит, когда Rho-фактор терминирует транскрипцию гена *ribB* *E.coli* в отсутствие его трансляции.

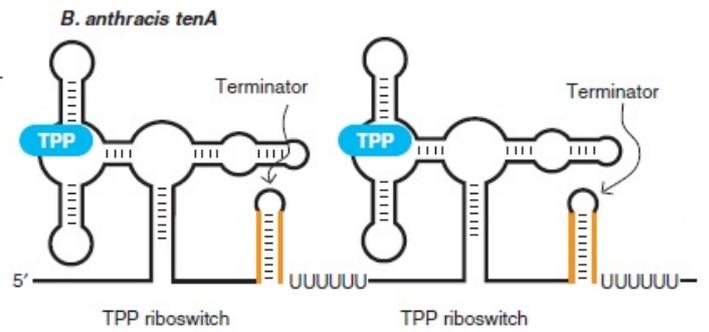
2.4. Структурная организация рибопереклювателей

Самый простой вариант структурной организации рибопереклювателя представляет собой соединение аптамерного домена, распознающего и связывающего определенный метаболит, и следующей за ним экспрессионной платформы (рис. 8). Для осуществления регуляторных функций рибопереклювателями такой простой архитектуры требуется 81-кратное изменение концентрации лиганда. Для того чтобы настроить систему генетической регуляции в клетке более сложным образом, рибопереклюватели используют сочетание нескольких аптамерных доменов

Tandem Riboswitches



$$R = Y_a + (1 - Y_a)Y_b$$



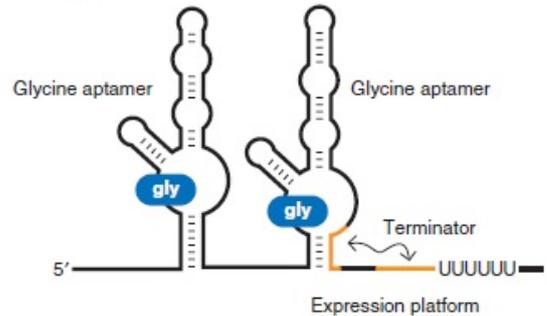
Tandem, Cooperative Aptamers



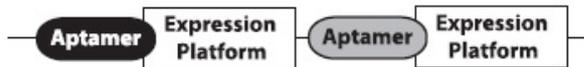
$$R = Y = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_D^n}$$

note: $1 \geq n \geq 2$

B. subtilis gcvT

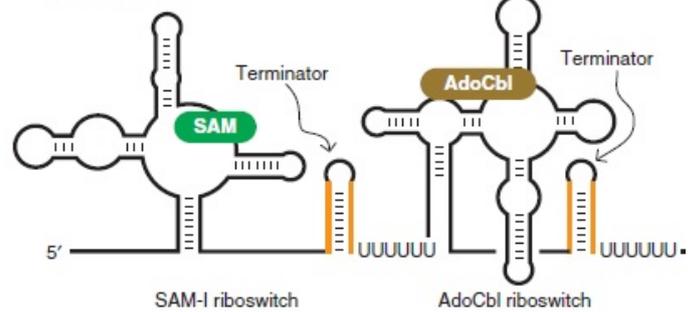


Tandem Riboswitches, Mixed Ligand Specificity



$$R = Y_a + (1 - Y_a)Y_b$$

B. clausii metE



Tandem Riboswitches



Cand. P. ubique bhmT

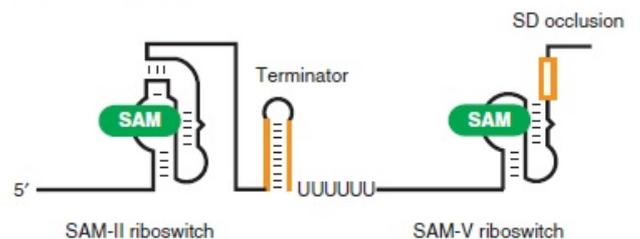


Рисунок 8. Архитектура tandemных рибопереключателй. Слева представлены схематичные изображения различных вариантов tandemных рибопереключателй. Формулы описывают кривую зависимости генетического ответа рибопереключателями в зависимости от концентрации лиганда L , где R - доля рибопереключателй, модулирующих экспрессию гена в ответ на связывание лиганда; Y - количество аптамеров, связывающих лиганд; K_D - константа диссоциации. Справа представлены примеры соответствующих tandemных рибопереключателй у бактерий.

и/или экспрессионных платформ. Рибопереключателй с такой сложной структурной организацией получили название tandemных.

Самый распространенный способ, который используется в клетке для снижения пороговой концентрации лиганда, это слияние двух гомологичных рибопереключателeй, действующих в тандеме [151]. Такая структурная организация приводит к тому, что рибопереключателeль способен реагировать на 40-кратное изменение в концентрации лиганда. Наиболее сложный, но эффективный способ для достижения этой цели является соединение двух гомологичных аптамеров в тандеме только с одной экспрессионной платформой (рис. 8). Таким образом, аптамеры связывают две молекулы одного лиганда одновременно для изменения в экспрессии прилегающих генов. Такой тип кооперации в структуре рибопереключателeля обычно используют глицин-связывающие рибопереключателeли [89], у которых связывание одной молекулы аминокислоты изменяет конфигурацию и увеличивает сродство другого аптамерного домена [26; 61; 135]. Теоретически, рибопереключателeли такой архитектуры могут реагировать на 9-кратное изменение концентрации лиганда.

Тандемные рибопереключателeли могут обладать смешанной специфичностью к лиганду, т.е. связывать различные соединения (рис.8). Одним из примеров является тандемный SAM- и AdoCbl-связывающий рибопереключателeль, локализованный в лидерной области мРНК гена *metE* *Bacillus clausii*[135].

С другой стороны, тандемные рибопереключателeли могут изменять свою архитектуру для осуществления разностороннего контроля экспрессии генов, например, и на уровне терминации транскрипции и на уровне инициации трансляции. Такой рибопереключателeль был успешно разработан в работе [103] и функционировал как «полосовой фильтр», т.е. активировал экспрессию гена в ответ на средний уровень концентрации лиганда. Когда концентрация лиганда становилась либо слишком низкой, либо слишком высокой, происходило выключение экспрессии.

Недавно был обнаружен тандемный рибопереключателeль с комбинированной регуляцией экспрессии гена у медленно растущей

океанической бактерии *Candidatus pelagibacter ubique*[114]. Структура такого рибопереключателѣ состоит из представителей SAM -II и SAM -V классов (рис. 8). Сначала в процессе транскрипции синтезируется SAM-II рибопереключателѣ, экспрессионная платформа которого контролирует дальнейшую транскрипцию в область структурного гена с помощью изменения вероятности формирования Rho-независимого терминатора в ответ на связывание SAM. Если преждевременная терминация транскрипции не случается, происходит образование полноразмерного мРНК транскрипта, который включает SAM-V рибопереключателѣ, контролирующѣй трансляцию гена посредством секвестирования SD-последовательности. При достаточной концентрации SAM для метаболических потребностей клетки, происходит образование коротких мРНК транскриптов, включающих последовательность SAM- II рибопереключателѣ, а в случае полноразмерных мРНК, присутствующих в клетке, SAM-V рибопереключателѣ супрессирует трансляцию гена, при этом не происходит деградации мРНК. Такой способ организации тандемного рибопереключателѣ является более энергетически выгодным для таких микроорганизмов, обитающих в среде с дефицитом питательных веществ.

2.5. ФМН-связывающѣе рибопереключателѣ

Более подробно в этом разделе будут рассмотрены представители класса ФМН-связывающих рибопереключателѣ, которые регулируют экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез и транспорт рибофлавина. Рибофлавин является предшественником кофакторов ФМН (флавинмононуклеотида) и ФАД (флавинадениндинуклеотида), биосинтез которых осуществляет бифункциональная флавинкиназа/ФАД-синтаза.

Как отмечалось ранее, класс ФМН-связывающих рибопереключателѣ является одним из наиболее распространенных и имеет большое количество представителей среди бактерий различных таксономических групп, таких как α -, β - и γ -*Proteobacteria*, *Deinococcales*, *Fusobacteriales*, *Bacillales*,

Lactobacillales, *Actinomycetales* *Clostridiales/Thermoanaerobacteriales* и *Thermotogales* [141]. Следует отметить, что первые доказательства регуляции экспрессии генов с участием рибопереключателей были экспериментально продемонстрированы на модели регуляции рибофлавинового оперона *ribGBANT B.subtilis* в работах [99; 155].

2.5.1. Пространственная структура *rfn*-элемента

Аптамерный домен рибопереключателя, ответственный за распознавание и связывание ФМН, получил название *rfn*-элемента. Известно, что *rfn*-элемент является высоко консервативным и обладает высокой избирательностью по отношению к своему лиганду. Чтобы выяснить причины такого селективного связывания, была расшифрована трехмерная структура комплекса *rfn*-элемента с ФМН для *Fusobacterium nucleatum*[127].

Анализ нуклеотидной последовательности *rfn*-элемента на предмет образования шпилечных структур показал, что аптамер состоит из 6 последовательно соединенных шпилечных структур (P1-P6) (рис. 9).

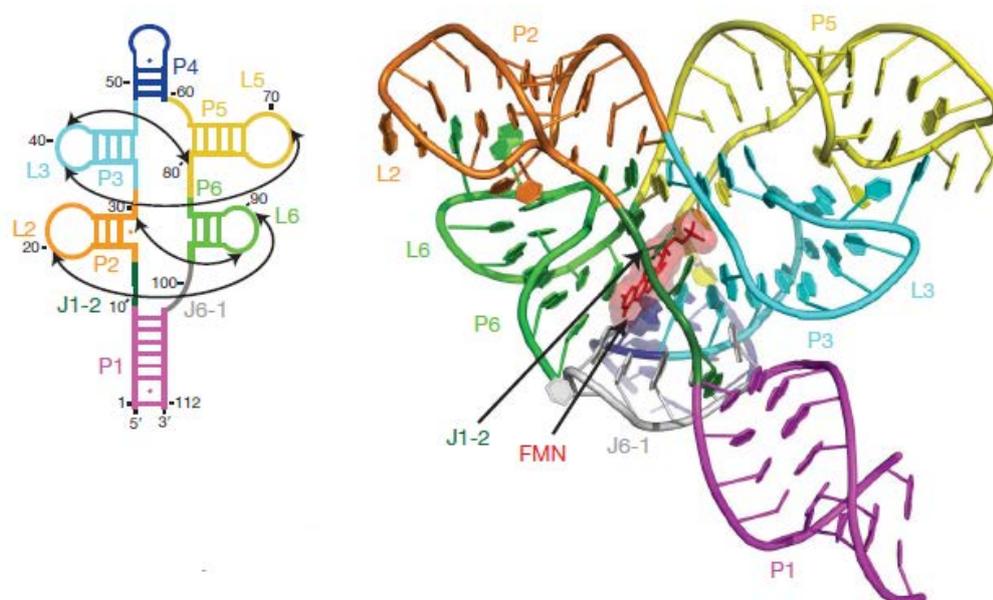


Рисунок 9. Пространственная структура *rfn*-элемента *F. nucleatum*.

Пространственная структура комплекса с ФМН определяется взаимодействием двух периферических доменов P2-P6 и P3-P5, каждый из которых состоит из двух шпилечных структур, формирующих третичные связи петля-петля (L2-L6 и L3-L5) и петля-спираль (L6- P2 и L3-P5). Шпилечные структуры P1 и P4 направлены в противоположные стороны относительно взаимодействующих периферических доменов. ФМН располагается внутри области соединения шпилечных структур. Плоское изоаллоксазиновое кольцо молекулы ФМН использует только один из четырех атомов кислорода для образования водородных связей с высоко консервативным нуклеотидом A99, тогда как фосфатный остов молекулы ФМН взаимодействует с несколькими консервативными гуаниновыми остатками. Важное взаимодействие между фосфатом ФМН и РНК осуществляется также посредством иона магния Mg^{2+} , который координирует кислород фосфата ФМН и с N7-атомом молекулы G33, а также способствует взаимодействию молекул воды с соседними нуклеотидами (рис.10).

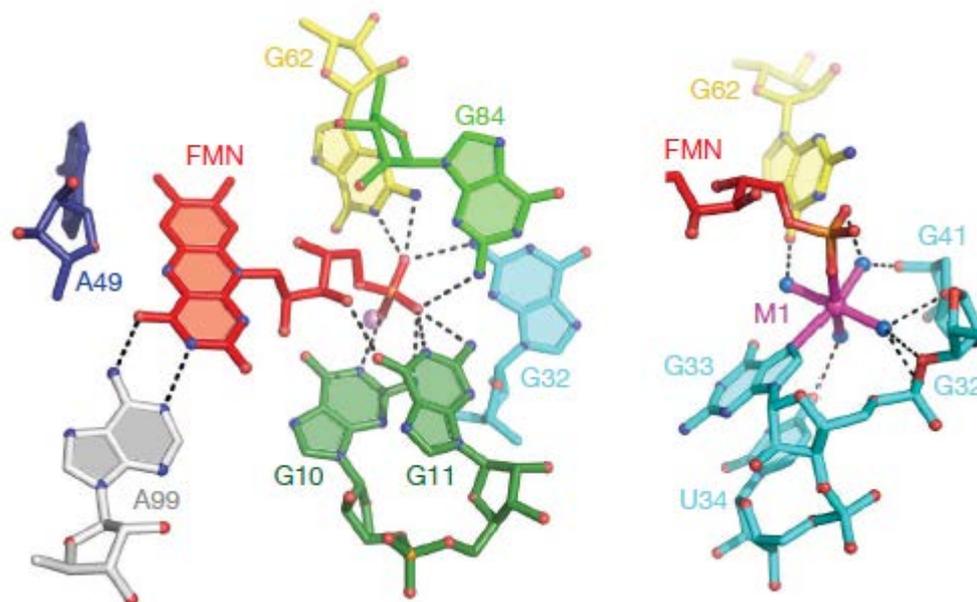


Рисунок 10. Связывание ФМН *rfn*-элементом.

Данные структурного анализа указывают на то, что большое значение для распознавания и связывания молекулы ФМН имеет фосфатная группа. Это заключение подтверждается экспериментальными данными, в которых

было показано, что сродство рибофлавина почти в 1000 раз ниже, чем у ФМН [127]. Интересным является также тот факт, что люмифлавин, у которого редуцирована боковая цепь, почти в такой же степени распознается и связывается *rfn*-элементом как и рибофлавин [127]. Более того, в работе [99] преждевременная терминация транскрипции мРНК *rib*-оперона *B. subtilis*, содержащей *rfn*-элемент, происходила при добавлении к реакционной смеси другого кофактора, а именно ФАД, концентрация которого была в 17 раз выше, чем ФМН. Согласно данной структурной модели ФАД может взаимодействовать с *rfn*-элементом с незначительными конформационными изменениями в связывающем кармане, что и является причиной более низкого сродства этой молекулы в сравнении с ФМН.

Таким образом, *rfn*-элемент обладает некоторой пластичностью в отношении связывающего лиганда. Это свойство ФМН-зависимых рибопереключателей может быть использовано для поиска аналогов лиганда, действие которых будет связано с антимикробным эффектом.

2.5.2. Механизмы действия ФМН-связывающих рибопереключателей

2.5.2.1. Регуляция генов, вовлеченных в биосинтез рибофлавина.

У бактерии *B. subtilis* методами биоинформатики обнаружены два ФМН-связывающих рибопереключателя, которые расположены перед рибофлавиновым опероном *ribGBAHT*, в состав которого входят гены биосинтеза рибофлавина, а также перед геном *uraA*, кодирующего транспортер рибофлавина из окружающей среды в клетку [51; 141].

В случае *rib*-оперона связывание ФМН с лидерной мРНК приводит к преждевременной терминации транскрипции в результате формирования Rho-независимого терминатора. В отсутствие ФМН, реализуется альтернативная структура, позволяющая дальнейшую транскрипцию в область структурных генов (рис. 11А)[99; 155]. Важное значение для образования взаимоисключающих структур лидерной мРНК в ответ на

связывание с ФМН играет целостность шпильки P1, правое плечо которой в отсутствие ФМН участвует в формировании структуры антитерминатора, тогда как в присутствии ФМН, шпилька P1 определяет формирование связывающего кармана.

Важным параметром для осуществления регуляции подобным образом является скорость, с которой РНК-полимераза удлиняет цепь мРНК *rib*-оперона [153]. Так, в экспрессионной платформе этого рибопереключателя были идентифицированы два сайта паузы РНК-полимеразы, что приводит к снижению ее скорости (рис. 11).

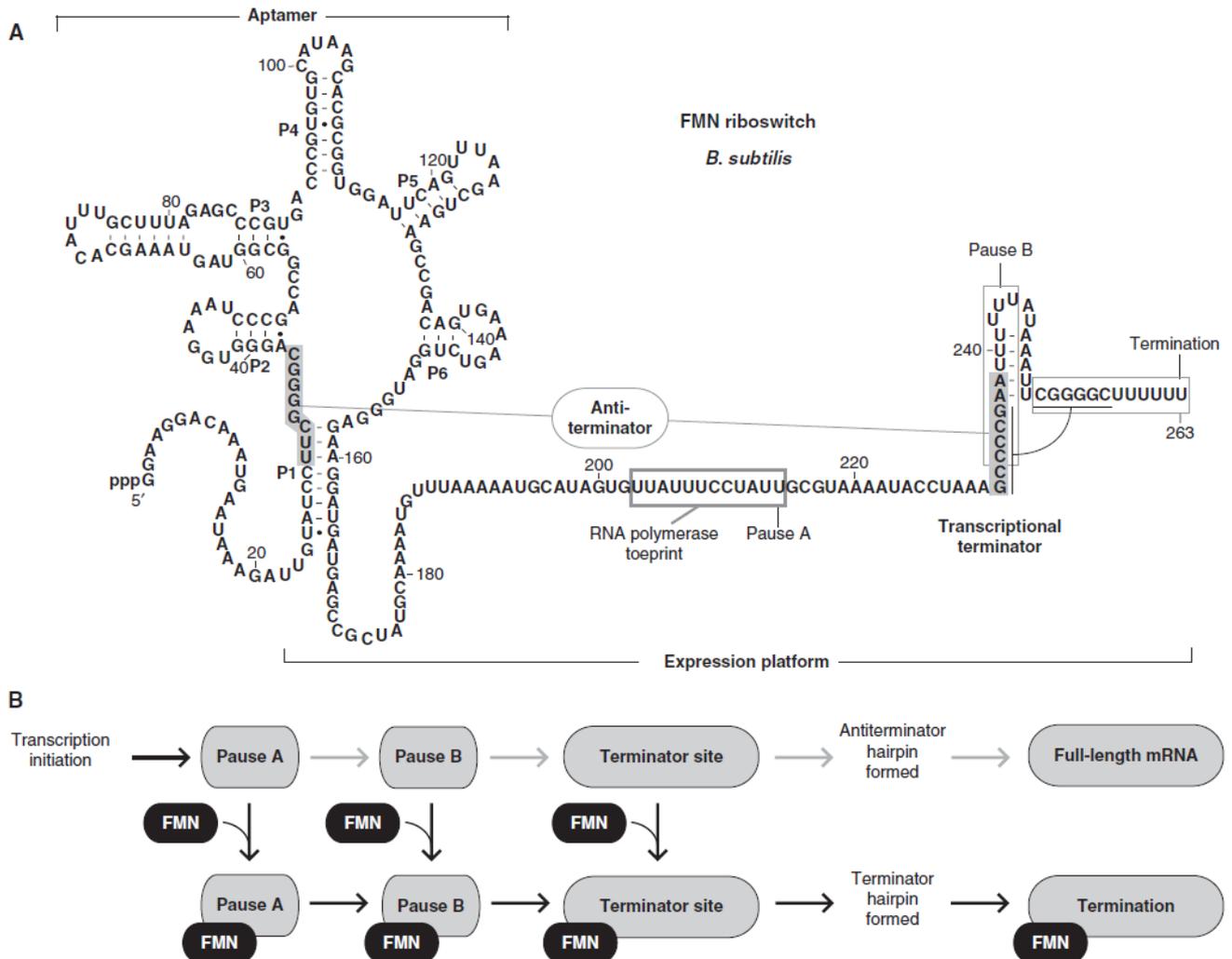


Рисунок 11. Модель регуляции *rib*-оперона *B.subtilis* с участием ФМН-связывающего рибопереключателя. (А) Вторичная структура ФМН-связывающего рибопереключателя. (Б) Кинетическая модель регуляции транскрипции генов *rib*-оперона. Стрелки черного цвета указывают путь, приводящий к терминации транскрипции, стрелки серого цвета – к полицистронной мРНК *rib*-оперона.

Наличие сайтов пауз обеспечивает более продолжительный временной интервал для связывания с ФМН и реализации определенной конфигурации мРНК, до того как будет синтезирована последовательность терминатора и будет принято решение о дальнейшей транскрипции. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, в которых разрушение сайтов пауз приводило к увеличению пороговой концентрации ФМН [153]. Следовательно, регуляторная функция ФМН-связывающего рибопереклювателя *rib*-оперона зависит также и от кинетических параметров.

В отличие от *B. subtilis*, гены биосинтеза рибофлавина у *E. coli* не сцеплены на хромосоме. С помощью методов биоинформатики присутствие упомянутого выше консервативного *rfn*-элемента было обнаружено лишь перед одним геном – *ribB*, который кодирует фермент 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу [51; 141]. Связывание ФМН с лидерной областью мРНК в данном случае приводит к подавлению трансляции этого гена в результате формирования шпильки секвестра, блокирующего сайт связывания рибосомы [4].

2.5.2.2. Регуляция генов, вовлеченных в транспорт рибофлавина

Многие грамположительные бактерии способны получать рибофлавин из окружающей среды, тогда как большинство грамотрицательных бактерий лишены такой возможности из-за отсутствия специфических транспортеров и вынуждены покрывать свои потребности в этом витамине за счет эндогенного синтеза.

Белки, способные транспортировать рибофлавин из окружающей среды в клетку были идентифицированы и охарактеризованы у *B. subtilis* [143], *Lactococcus Lactis* [25; 39] и у некоторых других бактерий. Рибофлавиновые транспортеры условно разделяют на три различных класса: гомологи *uraA* (*ribU*) *B. subtilis*, гомологи *ribM* *Corynebacterium glutamicum*, гомологи *impX*

Fusobacterium nucleatum[141]. Последний класс не был функционально охарактеризован.

Продукт гена *uraA* *B. subtilis* является частью модульного мульти-субъединичного рибофлавинового транспортера и принадлежит к недавно идентифицированному семейству ECF-транспортеров (energy coupling factor) [44; 105; 123; 138; 159]. Продукт гена *ribU* *L. lactis* также относится к этому семейству, поскольку его транспортная активность зависит от гидролиза АТФ [138]. Стоит отметить, что получена пространственная структура белка RibU *Staphylococcus aureus* [159]. *UraA* *B. subtilis* является протонным рибофлавиновым симпортером с высоким сродством к субстрату ($K_m = 5\text{--}20$ нМ). Известно, что нокаут этого гена разрушает рибофлавиновый транспорт и увеличивает потребности в экзогенном рибофлавине у ауксотрофного штамма, тогда как сверхэкспрессия гена *uraA*, наоборот, активирует транспорт рибофлавина [5; 143]. Установлено, что лидерная область мРНК гена *uraA* содержит *rfn*-элемент и, следовательно, в регуляции его экспрессии принимает участие ФМН-связывающий рибопереключатель. Результаты экспериментов по спонтанному гидролизу лидерной мРНК в присутствии ФМН и без, указывают на то, что наиболее вероятно, регуляция экспрессии гена *uraA* осуществляется на уровне инициации трансляции [155].

Рибофлавиновый транспорт также детально изучен у *L. lactis*[25; 39]. RibU обладает большим сродством к рибофлавину, ФМН и розеофлавину ($K_d = 0.6$ нМ для рибофлавина) и, было показано, что Trp⁶⁸ непосредственно участвует в связывании рибофлавина [39]. Что касается генетической регуляции экспрессии гена *ribU*, то она обусловлена присутствием в его 5'-некодирующей области *rfn*-элемента. По-видимому, ФМН-связывающий рибопереключатель в данном случае регулирует терминацию транскрипции *ribU* в зависимости от ФМН. Так, в работе [25] добавление экзогенного рибофлавина снижало уровень полноразмерного транскрипта гена *ribU* в опытах по Норзерн-гибридизации.

В отличие от YraA *B. subtilis* транспортер RibM (*pnuX*) *Corynebacterium glutamicum* является энергонезависимым и обладает гораздо более низким сродством к связывающему субстрату ($K_m = 11 \text{ мкМ}$) [143].

У бактерий рода *Streptomyces* обнаружен белок RibM, способный транспортировать рибофлавин и розеофлавин в клетку и обладающий высоким уровнем гомологии (> 65 %) среди транспортеров этой группы (также содержит 5 трансмембранных доменов). Известно, что ген, кодирующий этот транспортер у *S. davawensis*, локализован *ribBMAN*-опероне и транскрибируется в виде полицистронной мРНК, совместно с другими генами биосинтеза рибофлавина [53; 58]. В 5'-некодирующей области перед этим опероном также обнаружен *rfn*-элемент, свидетельствующий о регуляции генов с помощью ФМН-зависимого рибопереклювателя.

Таким образом, у многих прокариот обнаружены гены, кодирующие транспортеры рибофлавина. И, как правило, их экспрессия модулируется с участием ФМН-зависимого рибопереклювателя по принципу негативной регуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Данные об использованных в работе бактериальных штаммах и плаزمидах из коллекций лаборатории биохимической генетики Государственного института генетики и селекции промышленных микроорганизмов и ОМРБ ПИЯФ РАН представлены в таблице 2.

Таблица 2

Название штаммов, плазмид	Генотип	Происхождение
<i>Bacillus subtilis</i> :		
<i>B. subtilis</i> 168	Дикий тип	ВКПМ ¹
RKH25	<i>hisA</i>	Коллекция ОМРБ ПИЯФ ²
RK25-C1	<i>hisA ribC1</i>	- « -
RibB110	<i>Lys 42 ribB</i>	ВКПМ
SS119	<i>hisA amyE ::ribP1/P2-'lacZ</i>	Данная работа
SS091	<i>hisA amyE ::ribA101/A102-'lacZ</i>	- « -
SS123	<i>hisA amyE ::ribRT3/RT4-'lacZ</i>	- « -
SS131	<i>hisA ribB::mutin2</i>	- « -
SS052	<i>hisA ribA::mutin2</i>	- « -
SS135	<i>hisA ribT::mutin2</i>	- « -
SSC121	<i>hisA ribC1 amyE ::ribP1/P2-'lacZ</i>	- « -
SSC093	<i>hisA ribC1 amyE ::ribA101/A102-'lacZ</i>	- « -
SSC125	<i>hisA ribC1 amyE ::ribRT3/RT4-'lacZ</i>	- « -
SSC133	<i>hisA ribC1 ribB::mutin2</i>	- « -
SSC048	<i>hisA ribC1 ribA::mutin2</i>	- « -
SSC127	<i>hisA ribC1 ribT::mutin2</i>	- « -
SY	<i>hisA amyE ::Y1/2 (wt) -rbs-lacZ</i>	- « -
SY5	<i>hisA amyE ::Y1/2 (G95A) -rbs-lacZ</i>	- « -
SY11	<i>hisA amyE ::Y1/2 (A255T C256T) -rbs-lacZ</i>	- « -
SCY	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (wt) -rbs-lacZ</i>	- « -
SCY5	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (G95A) -rbs-lacZ</i>	- « -
SCY11	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (A255T C256T) -rbs-lacZ</i>	- « -

¹ Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

² Отделение молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова Российской академии наук

SYL	<i>hisA amyE ::Y1/2 (wt) -'lacZ</i>	- « -
SYL5	<i>hisA amyE ::Y1/2 (G95A) -'lacZ</i>	- « -
SYL11	<i>hisA amyE ::Y1/2 (A255T C256T) -'lacZ</i>	- « -
SCYL	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (wt) -'lacZ</i>	- « -
SCYL5	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (G95A) -'lacZ</i>	- « -
SCYL11	<i>hisA ribC1 amyE ::Y1/2 (A255T C256T) -'lacZ</i>	- « -
BY9	<i>Lys42 ribB amyE ::Y1/2 (C212G C213G)-rbs-lacZ</i>	- « -
BY10	<i>Ly42 ribB amyE ::Y1/2 (G231C G232C)-rbs-lacZ</i>	- « -
BY9/10	<i>Lys42 ribB amyE ::Y1/2 (C212G C213G G231C G232C) -rbs-lacZ</i>	- « -
BY50	<i>Lys42 ribB amyE ::Y1/50 (wt) -rbs-lacZ</i>	- « -
BY51	<i>Lys42 ribB amyE ::Y1/51 (wt)-rbs-lacZ</i>	- « -
BY52	<i>Lys42 ribB amyE ::Y1/52 (wt) -rbs-lacZ</i>	- « -
<i>E.coli:</i>		
TG1	<i>thi supE hsdΔ5 Δ(lac-proAB)/F' tra Δ36 proAB⁽⁺⁾ lacI^(q) lacZ ΔM15</i>	ВКПМ
MG1655	Дикий тип	- « -
AM4002	Как MG1655, но lacZ::Tn10 ribB::Tn5, Tc ^R Km ^R	- « -
<i>Плазмиды:</i>		
pMutin2	Ap ^f (<i>E.coli</i>) Em ^f (<i>B.subtilis</i>)	[139]
pDG246	Ap ^f (<i>E.coli</i>) Cm ^f (<i>B.subtilis</i>) MCS-'lacZ	- « -
pDG268	Ap ^f (<i>E.coli</i>) Cm ^f (<i>B.subtilis</i>) MCS-rbs-lacZ	[133]
pJEL250	rep _{R1} Ap ^R MCS- MCS-rbs-lacZ	[78; 140]
pMZ25	rep _{R1} Ap ^R ribB-rbs-lacZ	Данная работа
pMZ25-M1	rep _{R1} Ap ^R ribB(A11T G12C G13C G14C C15A)-rbs-lacZ	- « -
pMZ25-M2	rep _{R1} Ap ^R ribB(G140A G142A G144A)-rbs-lacZ	- « -

3.2. Состав питательных сред, используемых для выращивания бактерий

Полноценная среда LB для выращивания бактерий *E.coli*, *B.subtilis* (pH=7,0) в % (масс.): пептон – 1; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 0,5. Твердая среда содержит такой же состав с добавлением 2%(масс.) агара.

Минеральный состав минимальной среды Спицайзена для бактерий *B.subtilis* (pH=7,0) в г/л: K₂HPO₄·3H₂O - 18,3; KH₂PO₄ - 6,0;(NH₄)₂SO₄ - 2,0;

$\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ – 1,2. Среда Спицайзен I содержит добавки в % (масс.): 0,8 глюкоза; 0,04 казаминовые кислоты; 0,1 дрожжевой экстракт; 0,02 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Среда Спицайзен II содержит добавки в %(масс.): 0,8 глюкоза; 0,02 казаминовые кислоты; 0,16 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Необходимые для роста аминокислоты (лизин либо гистидин) добавляли в концентрации 50 мкг/мл.

Селективный рост определенных штаммов бактерий осуществлялся при выращивании клеточных культур с добавлением антибиотика в питательную среду в следующих концентрациях: ампициллин – 50 и 100 мкг/мл, канамицин – 25 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, эритромицин – 10 мкг/мл.

Для отбора трансформантов *E. coli* с рекомбинатными плазмидами использовали полноценную среду LB с добавлением ампициллина 100 мкг/мл и специального реагента - 2% X-gal в количестве 170 мкл на 100 мл агаризованной питательной среды.

Для трансформантов *B. subtilis*, у которых проверялась интеграция рекомбинатных плазмид в амилазный локус хромосомы, использовали индикаторную среду, содержащую амилопектиназу в концентрации 0,2 %.

3.3. Выделение хромосомной ДНК из бактерий *B. subtilis*

Клеточную культуру для выделения хромосомной ДНК выращивали с аэрацией в минимальной среде Спицайзена при 37°C в течение ночи. Далее ночную культуру объемом 10 мл осаждали центрифугированием, и затем клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора SSC (0,15M NaCl; 0,014 M $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$, pH=7,0). К полученной клеточной суспензии добавляли лизоцим 1 мг и выдерживали пробирки при 37°C в течение 5 минут. На следующем этапе добавляли 0,1 мл (1/10 объема) раствора 20% (масс.) SDS в 40% этаноле и помещали на водяную баню 50-60 °C. Через несколько минут раствор становился прозрачным и вязким. После этого пробирки охлаждали и добавляли 1 мл фенола pH=8,0, затем хорошо перемешивали. Далее разделение водной фазы и фенола проводили с

помощью центрифугирования при 5 000 об/мин в течение 20 минут. К отобранной водной фазе добавляли в двукратном объеме 96% охлажденный этанол, при этом перемешивать не рекомендуется. Выпавшую в осадок хромосомную ДНК собирали с помощью стеклянной палочки, и затем осадок растворяли в 100 мкл буфера.

3.4. Выделение плазмидной ДНК из *E.coli*

Плазмидную ДНК из клеток *E.coli* выделяли методом щелочного лизиса, описанного в [125].

Для дальнейшей трансформации выделение плазмидной ДНК осуществляли также другим способом. Для этого 1,5 мл клеточной культуры осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в 210 мкл STET-буфера (8% глюкоза; 0,5% triton-X100; 50mM EDTA; 10mM Tris·HCl pH=8,0). Далее к клеточной суспензии добавляли 15 мкл лизоцима 10мг/мл и выдерживали пробирки на кипящей бане в течение 45 секунд. После этого пробирки центрифугировали (13800 rpm 10 минут) и отбирали водную фазу. Плазмидную ДНК осаждали из водного раствора равным объемом изопропанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия pH=5,2 при -20°C в течение часа. Осадок промывали дважды 70% этанолом, и далее растворяли в буфере TE (Tris·HCl pH=8,0; 1mM EDTA).

3.5. Трансформация бактерий

3.5.1. Трансформация E.coli

Получение компетентных клеток и трансформацию бактерий *E.coli* осуществляли способом, описанном в [63].

3.5.2. Трансформация B.subtilis

Ночную культуру бактерий, выращенную в минимальной среде Спицайзен I, разбавляли в 10 раз свежей средой того же состава и растили с аэрацией при 37°C в течение 4,5 часов. Далее 1,5 мл подрощенной культуры переносили в 10 мл среды Спицайзен II и инкубировали с аэрацией в течение

1,5 часов при 37°C. В результате получали компетентную культуру *B.subtilis*. Для трансформации к 1мл компетентной культуры добавляли плазмидную ДНК и пробирки выдерживали при 37°C без качания в течение часа, далее еще 1 час с аэрацией (100 оборотов в минуту). Затем клетки высевали на селективную среду.

3.6. Конструирование транскрипционных фьюзов *ribP₁₋₃-lacZ* в гене *amyE* хромосомы *B.subtilis*

Для клонирования промоторных областей P1, P2 и P3 *ribGBAHT*-оперона, с помощью ПЦР амплифицировали соответствующие области хромосомы *B.subtilis*, используя следующие пары фланкирующих праймеров P1(5'-**tttgaattcggatcgaagggtgatgtt**-3') и P2(5'-**cgcggatccattgtttccctcccctc**-3'), ribA101 (5'-**cgcgaattcggaggccatttcgtctc**-3') и ribA102(5'-**cgcggatccagtgtcttctctatcgga**-3'), RT3(5' **cgcgaattcgagcgtgccggcaca**-3') и RT4(5'-**cgcggatccatcgcaatctttcaacga**-3') соответственно. Полученные фрагменты клонировали по сайтам рестрикции *EcoRI* и *BamHI* в полилинкерную последовательность экспрессионного интегративного вектора pDG268. Структура этого вектора позволяет проводить последующую интеграцию с клонированным фрагментом в ген *amyE* на хромосоме *B.subtilis*, содержащий в частности репортерный ген *lacZ*, лишенный собственного промотора, но при этом сохраняется SD-последовательность (рис.12).

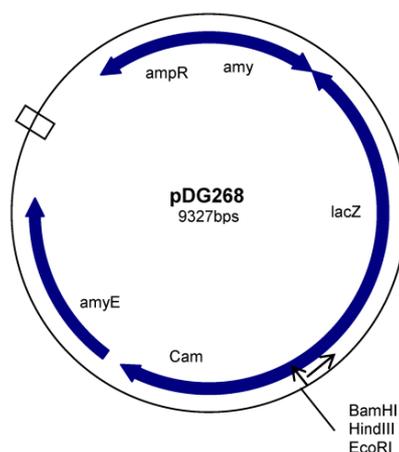


Рисунок 12. Структура вектора pDG268.

Лигазной смесью трансформировали штамм *E.coli* TG1 к устойчивости к ампициллину в концентрации 100 мкг/мл. Выделенную из трансформантов плазмидную ДНК рестрицировали с помощью *Xba*I и трансформировали реципиентные штаммы *B.subtilis* RKH25 и *B.subtilis* RK25-C1 к устойчивости по хлорамфениколу в концентрации 10 мкг/мл. Полученные клоны тестировали на активность β -галактозидазы.

3.7. Конструирование транскрипционных фьюзов, локализованных в области *rib*-оперона *B.subtilis*

Для получения транскрипционных фьюзов в области *ribGBAHT*-оперона использовали плазмиду pMutin2, которая, как и вышеупомянутая плазида pDG268, содержит репортерный ген *lacZ* (рис. 13) [139].

С помощью ПЦР и пар праймеров *ribAm1* (5'-**cgcaagctt**tgtggctcttgccgagc-3') и *ribAm2* (5'-**cgcggatccc**gctcttttcaggacacc-3'), *ribB1* (5'-**cgcaagctta**actattaaatgctcaaaagat-3') и *ribB2*(5'-**cgcggatccc**atttttaaatcatagtaaactg-3'), *ribT1* (5'-**cgcaagctt**tcgtttatgccgaatgaaaa-3') и *ribT2* (5'-**cgcggatcct**gctgaccttgacaac-3') с хромосомы *B.subtilis* амплифицировали следующие фрагменты *Am1 - Am2 = 339* п.н., *B1 - B2=305* п.н., *T1 - T2=303* п.н. соответственно.

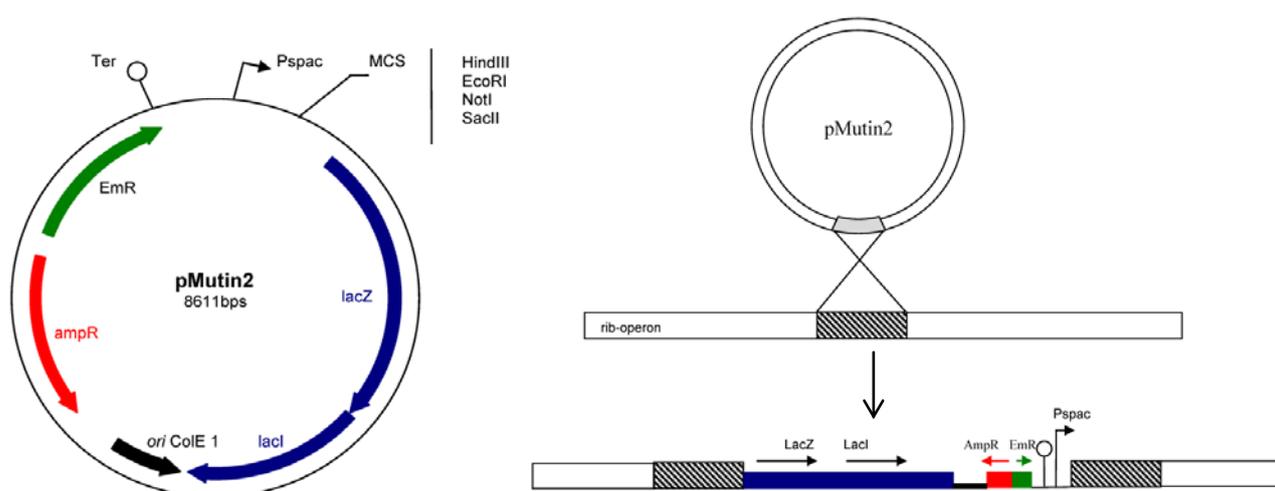


Рисунок 13. Схема интеграции плазмиды pMutin2 в гомологичную клонированному фрагменту область на хромосоме *B.subtilis* для получения транскрипционных фьюзов с *LacZ*.

Далее фрагменты клонировали по сайтам рестрикции *HindIII* и *BamHI* в полилинкерную область вектора pMutin2.

Полученными плазмидами трансформировали реципиентные штаммы *B.subtilis* RKN25 и *B.subtilis* RK25-C1 с отбором рекомбинантов Em^r, которые образуются в результате интеграции плазмиды в соответствующую, гомологичную клонированным фрагментам, область *rib*-оперона.

3.8. Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез лидерной области гена *uraA* *B.subtilis*, а также лидерной области гена *ribB* *E.coli* осуществляли с помощью ПЦР и специфических праймеров, содержащих нуклеотидные замены в определенном положении (таблица 3).

Таблица 3

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
ген <i>uraA</i> <i>B.subtilis</i>	
Y1	tttgaatt caatgatctgacagcttgcag(EcoRI)
Y2	cgcggatcc acaactaatttttactttcac(BamHI)
YM5	ctttacagcag A attcggtgag (M5)
YM17	ctcaccgaat T ctgctgtaaag (M5)
YM11	ggaaaaga TT ctttccgtttcg (M11)
YM23	aaacggaaag AA tctttccagc (M11)
YM27	Tttcatatgatcc ctagcctaattttc gaaac (Δ rfn)
YM29	aattaggctagg gatcatatg aaatttaattacatt(Δ rfn)
YM9	cgaaacc GG gcttttatatg (M9)
YM21	gatataaaaagc CC ggtttcg (M9)
YM10	atgaagc CC ttttttattggctg (M10)
YM22	gccataaaaaaa GG gcttcatat (M10)
Y50	cgcggatcc tccatcttctcccatcc(BamHI)
Y51	cgcggatcc gaaaattaggctaggcaaagaaa(BamHI)
Y52	cgcggatcc agccaataaaaaaacgctt(BamHI)
ген <i>RibB</i> <i>E.coli</i>	

E1	cccgaattc cctgtactgataggtgttg(EcoRI)
E8	cccgatccg taccaaaagaggaaagtag (BamHI)
E5	tattctc TCCCA ggggcgaaattccc (M1)
E4	ttcgcccc TGGGA gagaataagcgg (M1)
E13	ccggatggga AaAaA taacgattctgtc (M2)
E14	gaatcgтта TtTtT tcccatccgg (M2)

С этой целью сначала были наработаны фрагменты, фланкирующие 5'- и 3'-конец соответствующих генов с хромосомы *B.subtilis* 168 либо с хромосомы *E.coli* MG1655. Далее проводили их состыковку и наработку мутантных лидерных областей по фланкирующим праймерам Y1, Y2 для гена *uraA* *B.subtilis* и E1, E8 для гена *ribB* *E.coli*. Полученные фрагменты в дальнейшем были использованы для клонирования в экспрессионные интегративные вектора.

3.9. Конструирование транскрипционных и трансляционных фьюзов *uraA-lacZ* в гене *amyE* хромосомы *B.subtilis*

Конструирование транскрипционных и трансляционных фьюзов *uraA-lacZ* осуществлялось на основе векторов pDG268 и pDG246 соответственно. Оба этих вектора содержат фрагменты гена *amyE*, позволяющие осуществлять их направленную интеграцию в амилазный локус хромосомы *B.subtilis*. Структура вектора pDG268 изображена на рисунке 12. Единственное отличие вектора pDG246 состоит в том, что ген *lacZ* не содержит SD-последовательности, таким образом, клонирование промоторных областей перед *lacZ* позволяет получать в этом случае трансляционные фьюзы.

На первом этапе с помощью ПЦР были наработаны фрагменты лидерной области гена *uraA* по фланкирующим праймерам Y1 и Y2, содержащие сайты узнавания для рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* соответственно. Далее полученные фрагменты с лидерной областью дикого типа, а также ее

мутантные варианты M5, M11, Δrfn были клонированы в полилинкерную область векторов pDG268 и pDG246, а лидерные области с мутациями M9, M10, M9/10 - только в вектор pDG268. Также с помощью ПЦР с хромосомы *B.subtilis* 168 были получены фрагменты лидерной области дикого типа разной протяженности от промотора – Y1-Y50, Y1-Y51 Y1-Y52, которые клонировали по сайтам узнавания для рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* в вектор pDG268.

Полученными плазмидами трансформировали штаммы *B.subtilis* RKN25, *B.subtilis* RK25-C1, либо *B.subtilis* *RibB110* с отбором рекомбинантов Cm^R . Интеграция в амилазный локус хромосомы реципиентных штаммов проверяли на индикаторной среде с амилопектиназуrom.

3.10. Конструирование транскрипционных фьюзов *ribB-lacZ*

Конструирование транскрипционных фьюзов лидерной области гена *ribB* *E.coli* с репортерным геном *lacZ* осуществлялось на основе низкокопийной плазмиды pJEL250 [78; 140]. Этот вектор содержит ген устойчивости к ампициллину (Am^R), полилинкер, позволяющий осуществлять клонирование по сайтам узнавания для рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*. После полилинкерной области располагается структурный ген *lacZ*, лишенный собственного промотора, но с SD-последовательностью.

На первом этапе с помощью ПЦР и праймеров E1, E8 с хромосомы *E.coli* MG1655 был наработан фрагмент лидерной области гена *ribB* дикого типа. А также с помощью сайт-направленного мутагенеза, для которого были использованы пары праймеров с нуклеотидными заменами E4, E5 и E13, E14, были получены лидерные области гена *ribB* с мутациями M1 и M2 соответственно (таблица 3). Клонирование полученных фрагментов E1-E8 (wt, M1, M2) осуществлялось по сайтам узнавания рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* в вектор pJEL250 для получения транскрипционных фьюзов *ribB-lacZ*. Далее рекомбинантными плазмидами pMZ25, pMZ25-M1 pMZ25-M2 (таблица 2) трансформировали штамм *E.coli* AM4002 к устойчивойти по ампициллину в

концентрации 100 мкг/мл. У полученных трансформантов определяли активность β -галактозидазы.

3.11. Определение активности β -галактозидазы [98]

3.11.1. В культуре клеток *E.coli*

Бактерии *E.coli* AM4002, содержащие транскрипционные фьюзы *ribB-lacZ* выращивали при 30°C в течение ночи на полноценной среде LB с добавлением 50 μ M рибофлавина и 50 мкг/мл ампициллина. Затем клетки отмывали и разбавляли 1:25 свежей средой, содержащей 50 μ M рибофлавина и/или с 25 мкг/мл ВСМ в зависимости от варианта. Клетки растили при 30°C в течение 2-2,5 часов и измеряли плотность полученной клеточной суспензии по поглощению при 450 нм. Бактериальные клетки для определения активности β -галактозидазы отмывали от ростовой среды и переносили в Z-буфер (0,06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,01 M KCl; 0,001 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). К полученной суспензии добавляли 5%(об.) хлороформа и 0,005%(об.) SDS, и выдерживали пробирки в термостате при 28°C 10 минут. Реакцию запускали добавлением 0,8 мг/мл ОНФГ (о-нитрофенил- β -D-галактозида), останавливали добавлением 0,3M Na_2CO_3 . Далее для каждой пробы измеряли поглощение при 420 нм. Активность β -галактозидазы, выраженную в единицах Миллера, вычисляли по следующей формуле:

$$\text{активность} = \frac{1000 \cdot OD_{420}}{OD_{450} \cdot V(\text{мл}) \cdot \tau(\text{мин})}$$

,где $V(\text{мл})$ – объем клеточной суспензии, взятой для определения, в мл;

$\tau(\text{мин})$ – время реакции в минутах.

3.11.2. В культуре клеток *B.subtilis*

Бактерии *B.subtilis*, содержащие транскрипционные и трансляционные фьюзы с геном *lacZ*, выращивались в различных питательных средах в зависимости от эксперимента, при 37°C до средней экспоненциальной фазы роста. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на спектрофотометре по поглощению при 600 нм. Для определения активности

β -галактозидазы получали клеточный осадок из 1 мл подброшенной культуры. Далее к осадку добавляли 700 мкл Z-буфера, 7 мкл PMSF 100 мМ (ингибитор протеаз), лизоцим 0,25 мг/мл, 7 мкл triton-X100 10% и тщательно перемешивали. В полученную клеточную суспензию вносили 200 мкл ОНФГ 8 мг/мл для начала реакции и инкубировали при 28°C. При добавлении 400 мкл Na₂CO₃ реакция останавливалась. Единицы активности β -галактозидазы вычисляли по формуле.

3.12. Выделение суммарной РНК из бактериальных клеток

Суммарную РНК выделяли из клеточной суспензии (OD₆₀₀=0,5-0,6) объемом 10-20 мл. Клетки осаждали с помощью центрифуги при 4°C, затем осадок промывали охлажденным буфером 1 (10mM Tris-HCl pH=8,0; 100mM NaCl; 1mM EDTA). Разрушение клеточной стенки бактерий проводили в буфере 2 (50mM Tris-HCl pH=8,0; 8% sucrose, 0,5% triton X100; 10mM EDTA), содержащим 4 мг/мл лизоцима, на льду в течение 5 мин. К полученному клеточному лизату добавляли фенол pH=4,3 (Sigma), 10mM EDTA и нагревали до 65°C в течение 15 мин, перемешивая каждые 5 мин. В случае бактерий *B.subtilis* также добавляли стеклянные шарики для механического разрушения клеточной стенки. Далее пробирки охлаждали и центрифугировали 10 мин 13000 об/мин при 4°C. Водную фазу аккуратно переносили в новую пробирку, а фенол и границу раздела фаз повторно экстрагировали с помощью 0,1M ацетата натрия pH=5,5. Водные фазы одного варианта объединяли и проводили экстракцию смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт 125:24:1 pH=5,5 (готовая смесь Sigma), и далее хлороформ-изоамиловый спирт 24:1. Суммарную РНК осаждали из водного раствора тремя объемами 96% спирта в присутствии 0,3 M ацетата натрия pH=5,2 и при -70°C в течение часа. Осадок промывали дважды 80% этанолом, и далее растворяли в стерильной дистиллированной воде, предварительно обработанной DEPC.

Чтобы избавиться от примесных количеств ДНК, полученный препарат РНК обрабатывали ДНКазой (turbo DNase, «Ambion») в буфере, рекомендованном производителем, при 37°C в течение 1 часа. Инактивацию фермента проводили с помощью фенол-хлороформ, хлороформ экстракции с последующим переосаждением как описано выше. Концентрацию полученных суммарных РНК определяли спектрофотометрическим способом.

3.13. Определение старта транскрипции

Определение старта транскрипции проводили методом удлинения праймера. Суммарную РНК выделяли согласно стандартной методике. В случае промоторной области P2 *rib*-оперона *B.subtilis* как источник РНК использовали штамм *B.subtilis* SS131 (*hisA ribB::mutin2*), который выращивали на трансформационной среде Спицайзена с добавками (1-гистидин 50 мкг/мл; эритромицин 5мкг/мл) до середины экспоненциальной фазы роста. В случае области P3 *rib*-оперона использовали штамм *B.subtilis* SSC125 (*hisA ribC1 AmyE::RT3-RT4*), который выращивали на LB среде в присутствии хлорамфеникола (10 мкг/мл) до середины экспоненциальной фазы роста ($OD_{600}=0,500$).

Для определения структуры промотора гена *upaA B.subtilis*, были использованы препараты суммарных РНК, выделенных из штаммов *B. subtilis RKH25* и его изогенного варианта *B. subtilis RKH25-C1*, выращенных на полноценной LB-среде.

Полученные препараты РНК обрабатывали ДНКазой («Ambion») и концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора HIV Reverse Transcriptase («Ambion») согласно рекомендациям производителя. На одну реакцию брали РНК в количестве 10-30 мкг, праймер [5`-³²P]-*ribA103* (5`-gccgaatatggttaagctc-3`) 10-15 pmol в случае промотора P2 *rib*-оперона, праймер [5`-³²P]-RT4 (5`-cgcggatccatcgcaatcttttcaaасga-3`) 10-15 pmol в случае промотора P3 *rib*-

оперона, праймер [5'-³²P]-Y10 (5'-gaatttcaccctgccccgaa-3') 10-15 pmol в случае промотора гена *uraA*.

3.14. Транскрипция *in vitro*

Для изучения экспрессии гена *uraA B.subtilis*, мы провели реакцию транскрипции в очищенной системе *in vitro*. Для этого с помощью ПЦР и пары праймеров Y1 и Y2 были наработаны фрагменты лидерной области дикого типа, а также ее мутантные варианты M9, M9/10 и M11, которые использовались в качестве ДНК-матриц. В буфере TB50Mg3 (40mM Tris·HCl pH=8,0; 3mM MgCl₂; 50mM NaCl) смешивали 0,2 мкг ДНК-матрицы, 1 U холофермента РНК-полимеразы *E.coli* («Usb») и 25μM нуклеозидтрифосфатов (АТР, GTP, CTP) и инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Далее к реакционной смеси добавляли [α-³²P]УТР для мечения соответствующего транскрипта и инкубировали еще 5 минут при комнатной температуре. Затем реакционную смесь делили на две равные части, в одну из которых вносили 50μM ФМН и выдерживали в течение 5 минут при комнатной температуре. После этого добавляли смесь нуклеотидов 50 μM и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора (1X TBE, 8 M мочевины, 20 mM ЭДТА, 0,025% ксилена, цианол, и 0,025% бромфенолового синь). РНК очищали с помощью фенол-хлороформ/хлороформ экстракции и последующего переосаждения. Разделение продуктов реакции производили с помощью электрофореза в 8% ПААГ.

3.15 Транскрипция *in vitro* на твердой фазе

Базовые принципы метода транскрипции *in vitro*, в котором элонгационный комплекс иммобилизуется на твердой фазе описано в [107]. В следующих разделах подробно описывается процедура выполнения экспериментов в рамках конкретной задачи.

3.15.1. Определение расположения фактор-независимого терминатора транскрипции гена *uraA* *B.subtilis*

С помощью ПЦР и праймеров bioY1 (5'-Bt-tcaatgatctgacagcttgacag-3') и Y2 (табл. 2) была наработана ДНК-матрица, содержащая на 5'-конце биотин. 5 pmol биотинилированной ДНК-матрицы bioY1-Y2 смешивали в транскрипционном буфере 1xТВ (50mM Tris·HCl pH=8,0; 10mM MgCl₂; 50mM KCl) с 5 µl авидиновых шариков (NeutrAvidin Agarose Resins 'Termo Scientific', США), предварительно уравновешенных в том же буфере ТВ. Полученную смесь выдерживали 10 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Далее добавляли 1U холофермента РНК-полимеразы *E.coli* («Usb», США) и инкубировали в течение 5 минут при 37°C для получения открытого комплекса. После этого в реакционную смесь вносили нуклеотиды (УТР, АТР, СТР), концентрация которых в полученном растворе составляла 25µM, и инкубировали 5 минут при 37°C. В результате образовывался элонгационный комплекс (ЭК) с РНК длиной 11 нуклеотидов. Авидиновые шарики, на которых иммобилизовался ЭК11, отмывали 5 раз транскрипционным буфером ТВ для удаления свободных нуклеотидов. Далее в реакционную смесь вносили 5 µM GTP, и в результате ЭК становился длиной 13 нуклеотидов. После этого также следовала серия отмывок ТВ-буфером. На следующем этапе добавляли радиоактивную метку [α-³²P]УТР и АТР,СТР (5 µM), включение которой в растущую цепь РНК осуществлялось в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее вносили дополнительно 5 µM УТР и также выдерживали реакционную смесь при комнатной температуре 5 минут. В результате мы получали стабильный стартовый ЭК22, который отмывали от не включенной метки и нуклеотидов ТВ-буфером 5 раз. Полученный ЭК22 делили на две равные части, в одну из которых вносили 50 µM ФМН и по истечении 5 минут возобновляли реакцию транскрипции добавлением 50 µM смеси нуклеотидов, и инкубировали 10 минут при 37°C. После этого пробирки снова делили на две равные части, одну из которых промывали сначала буфером ТВ1000 (50mM Tris·HCl

pH=8,0; 10mM MgCl₂; 1M KCl) и 3 раза буфером ТВ для удаления продуктов терминации. РНК очищали с помощью фенол-хлороформ/хлороформ экстракции и последующего переосаждения. Продукты реакции транскрипции анализировали в 12% ПААГ в присутствии РНК-маркера.

3.15.2. Транскрипция лидерной области гена *ribB* *E.coli* в очищенной системе *in vitro*

Для этого эксперимента методом ПЦР были наработаны фрагменты лидерной области гена *ribB* дикого типа, а также содержащие мутации М1 и М2 с помощью фланкирующих праймеров ECD (5'-gagcgatttgctcaattttttc-3') и ECR (5'- cacgcagcgcagccagtgcatTTTcaac-3'). 5 pmol ДНК-матрицы смешивали в ТВ-буфере с 14 pmol биотинилированной РНК-полимеразы и 6 pmol σ^{70} и инкубировали 5 минут при 37 °С. Далее вносили РНК-затравку GCU (10 μ M) и 25 μ M нуклеотиды (CTP,UTP,ATP), затем продолжали инкубировать 10 минут. Для иммобилизации реакции транскрипции, в полученную реакционную смесь добавляли авидиновые шарики и непрерывно перемешивали в течение 5 минут. Авидиновые шарики с иммобилизованным ЭК11 промывали 2 раза буфером ТВ1000 и 3 раза буфером ТВ100 (40 mM Tris·HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 100mM NaCl). Далее вносили [α -³²P]CTP и 5 mM GTP и ATP и выдерживали 5 минут при комнатной температуре. После этого проводили серию отмывок буфером ТВ50Mg3. В реакционную смесь со стартовым ЭК24 добавляли ингибитор РНКаз («Promega») и делили на 4 части по 10 μ l, в одну из которых добавляли 100 μ M ФМН и/или 0,4 μ M Rho. Затем образцы инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Реакцию транскрипции во всех образцах возобновляли добавлением 10 μ M NTPs and 1 mM ATP и выдерживали 10 минут при 37 °С. После завершения реакции добавляли равный объем стоп-раствора. РНК очищали с помощью фенол-хлороформ/хлороформ экстракции и последующего переосаждения. Продукты реакции транскрипции анализировали в 6% ПААГ.

3.16. Анализ формирования 30S-инициаторного комплекса на мРНК (тоупринт-анализ)

В основе метода тоупринт-анализа лежит процесс обратной транскрипции. При связывании 30S субъединицы рибосомы с мРНК происходит блокирование синтеза кДНК в области +16÷+18 относительно первого нуклеотида иницирующего кодона (рис. 14) [57; 121]

Получение мРНК.

На первом этапе методом ПЦР были наработаны фрагменты с плазмид pDG246::Y1-Y2(wt) и pDG246::Y1-Y2(M11) с использованием пары праймеров Y7 (5'- taatacgaactcactatagggaactaaatttcatatgatcaatcttcgg-3'), который содержит T7-промотор, и 246-4 (5'-taagttgggtaacgccagg-3'). Далее полученные фрагменты использовали в качестве матриц для синтеза соответствующих мРНК в процессе реакции транскрипции с участием T7 РНК-полимеразы.

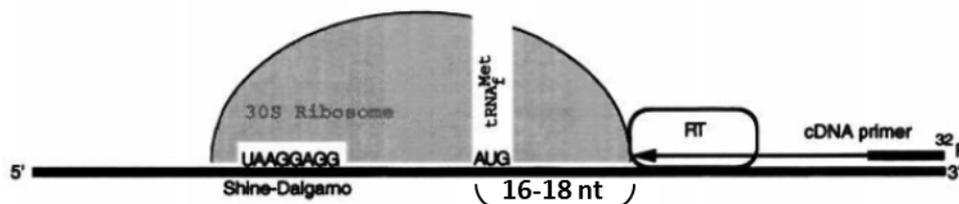


Рисунок 14. Принцип тоупринт-анализа. 30S-инициаторный комплекс, образованный в результате взаимодействия 30S субъединицы рибосомы с SD-последовательностью на мРНК, блокирует синтез кДНК в процессе реакции обратной транскрипции.

Кинирование праймера.

25 пмоль праймера 246-4 и 5 мкл $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (4000 Ки/мм) инкубировали с 10 U полинуклеотидкиназы T4 («BioLabs», США) в 20 мкл буфера (70 mM Трис HCl, pH=7.6; 10 mM MgCl₂ ; 5 mM DTT) в течение часа при 37°C. Для очистки от не включенной метки использовали колонки G50 («GE Healthcare»).

Тоупринт-анализ.

6,4 пмоль меченого праймера $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-246-4}$ смешивали с 3,2 пмоль мРНК в 20 мкл буфера SB-Mg (10 mM tris-acetate, pH 7.4, 60 mM NH₄Cl, 6 mM β-

mercaptoethanol). Далее полученную смесь делили на 2 части, в одну из которых добавляли 50 мкМ ФМН. Далее образцы нагревали 3 минуты при 65°C для денатурации, затем отжиг праймера на мРНК осуществляли при 50°C в течение 20 минут. Затем пробирки охлаждали на ледяной бане и в каждую вносили 1 мкл буфера SB+Mg (10 mM tris-acetate, pH 7.4, 60 mM magnesium acetate, 60 mM NH₄Cl, 6 mM β-mercaptoethanol). Препарат 30S субъединицы рибосомы предварительно активировали при 37°C в течение 15 минут. 30S инициаторный комплекс формировался при добавлении к 2 мкл полученной смеси, содержащей 0,53 пмоль мРНК, 10-20 пмоль незаряженной tRNA^{fMet}, 1мкл dNTPs (3.75 mM каждый dATP, dGTP, dCTP, dTTP) и 1 мкл препарата 30S субъединицы рибосомы в объеме 9 мкл и полученную смесь инкубировали 10 минут при 37°C.

Достройка праймера 246-4 осуществлялась при добавлении 1U HIV обратной транскриптазы («Ambion», США) и инкубирования реакционной смеси в течение 15 минут при 37°C. После окончания реакции к образцам добавляли стоп-раствор в равном объеме. Анализ продуктов реакции проводили в 8%ПААГ.

3.17. Анализ вторичной структуры РНК («In-line probing») [116]

Получение мРНК

На первом этапе методом ПЦР проводили наработку ДНК-матриц с использованием двух пар праймеров: Y7 (5'-taatacgactcactatagggaactaaatttcatatgatcaatcttcgg-3'), Y6 (5'-ggaacgggaaatttaacagca-3') и Y7, YTer1 (5'-aaaaaacggcttcatatataaaag-3'). В результате получали фрагменты полноразмерной лидерной области Y7-Y6 и ее укороченный вариант Y7-YTer1, содержащие промотор для T7 РНК-полимеразы. Соответствующие мРНК были получены в результате реакции транскрипции, для которой использовали 1 мкг ДНК-матрицы, 250мкМ смесь нуклеотидов, а также 20U T7 РНК-полимеразы («Ambion», США).

Полученную РНК очищали методом фенол-хлороформ/хлороформ экстракцией с последующем переосаждением.

Мечение мРНК

Для мечения РНК использовали набор реагентов KinaseMax Kit («Ambion»). Сначала проводили дефосфорилирование в условиях, рекомендованных производителем. Затем с помощью киназной реакции на 5'-конец РНК присоединяли меченый фосфат. Далее $5'^{32}\text{P}$ -мРНК очищали через 8% ПААГ.

In-line probing.

Реакцию спонтанного гидролиза $5'^{32}\text{P}$ -мРНК (80 cps) проводили в буфере (50 mM Tris-HCl pH=8.3, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl) в присутствии либо нет 100μM ФМН в течение 40 часов при комнатной температуре в темноте.

Такое же количество $5'^{32}\text{P}$ -мРНК подвергали ферментативному расщеплению с помощью РНКазы T1 при 55 °C в течение 10 минут, а также щелочному гидролизу в Na₂CO₃-буфере при 90 °C в течение 5 минут (ферменты и буферы из набора, «Ambion»). Анализ продуктов реакции проводили в 6% ПААГ.

3.18. Количественная ПЦР (RT-qPCR)

Реакция обратной транскрипции

Для изучения внутренних промоторов *rib*-оперона *B. subtilis*, суммарную РНК выделяли из штаммов RKN25 и RK25-C1, SS131 и SSC133. кДНК получали из 50 нг суммарной РНК в результате реакции обратной транскрипции с реверсивными праймерами (табл. 3) и набором HIV Reverse Transcriptase («Ambion»). В случае штаммов с инсерцией *ribB::Mutin2* (SS131 и SSC133) для реакции брали по 2 мкг суммарной РНК.

Для изучения регуляции гена *ribB E.coli*, суммарную РНК выделяли из штамма AM4002, содержащего плазмиду pMZ25 и выращенного в полноценной LB-среде в присутствии 50μM рибофлавина и с добавлением

либо нет 25 мкг/мл ВСМ. Для реакции обратной транскрипции брали по 0,05 мкг суммарной РНК и следующие группы праймеров: А) по 9 pmol S16rev, Def4, o65; Б) по 9 pmol S16rev, Def4, o246-4. (табл. 4)

Полученные смеси РНК и праймеров нагревали до 80°C в течение 3 мин, затем пробирки охлаждали в ледяной бане. Далее в каждую пробирку добавляли буфер для обратной транскрипции (50mM Tris·HCl pH=8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 5mM DTT), 0,5 mM ∑dNTPs, ингибитор РНКаз («Amersham») и 1U фермента HIV Reverse Transcriptase («Ambion»). Реакцию проводили при 42°C в течение часа, далее фермент инактивировали нагреванием до 92°C в течение 10 мин.

Таблица 4.

Праймер	Последовательность 5'→3'
Изучение внутренних промоторов rib-оперона <i>B.subtilis</i>	
16S-rev	agagtgcccaactgaatgct
16S-for	cagctcgtgctgagatgt
ribG-rev	cctcaatgccagctctttc
ribG-for	aaagagtgttcgtggcgatg
ribB-rev	ttcgattgtgcctgtttcttc
ribB-for	atcaaaactgacggcaaaacc
ribA-rev	casaaatgcgacatgctctt
ribA-for	acgctgcctactgattttgg
ribT-rev	attccttgatggcgatgaga
ribT-for	gagcaatcggagtcgaaaaa
Изучение регуляции гена <i>ribB E.coli</i>	
16S-for	caagcggaggagcatgtgg
16S-rev	tcacaacacgagctgacgac
Def4	acttcttctaccggttagca
Def11	agatttatgtcagttttgcaag
E65	gtcctttgagttcgacacc
E20	gcttattctcagggcgggg
246-4	taagttgggtaacgccaggg
B80	acgcgcagttaatcccacag

Количественная ПЦР [106]

ДНК-матрицей для количественной ПЦР служила кДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции, описанной выше. В качестве

эндогенного контроля использовали праймеры на 16S рРНК и на ген, кодирующий деформилазу (*def*, *E.coli*).

ПЦР-продукт, соответствующий каждой паре праймеров, амплифицировался с кДНК с помощью SYBRgreen Supermix (Bio-Rad). Изменение показателей флуоресценции в ходе полимеразной реакции детектировали с помощью прибора iCyclerIQ5 (Bio-Rad). Использовался следующий температурный режим: 1цикл 95°C 3 минуты; 40циклов 95°C 10сек, 56°C 40сек. Значение порогового цикла C_t определялось автоматически специальным программным обеспечением, поставляемым в комплекте с прибором. Уровень транскрипта определялся методом относительных стандартных кривых, как описано в руководстве, прилагаемом к прибору. Стандартная кривая для каждого ПЦР продукта была получена посредством измерения значения порогового цикла C_t для серии разведений (от 1:5 до 1:3125 с шагом в 5 раз каждое последующее разведение) соответствующих кДНК.

4. 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. 15).

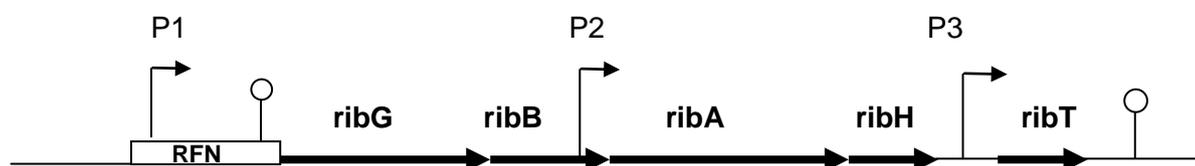


Рисунок 15. Структура рибофлавинового оперона. Жирными стрелками на рисунке показано взаимное расположение и направление транскрипции пяти генов *rib*-оперона – *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH* и *ribT*. Тонкими стрелками обозначено направление транскрипции с промоторов P1, P2 и P3 в *rib*-опероне. Шпильчатые структуры показывают локализацию Rho-независимых терминаторов транскрипции.

С основного промотора *rib*-оперона P1 TTGCGT-17 п.н.-ТАТААТ осуществляется транскрипция всех генов *rib*-оперона в виде одной полицистронной мРНК. Регуляция транскрипции, в случае промотора P1, осуществляется с помощью ФМН-зависимого рибопереключателя. 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 [99]. Ключевую роль в этом процессе играет целостность консервативного участка лидерного транскрипта – так называемого *rfn*-элемента, формирующего структуру домена связывания флавинов [51; 71].

Заключение о функциональной активности промоторов P2 и P3 было сделано на основании опытов по Норзерн-гибридизации [109]. Сведений о регуляции промотора P2 крайне мало. Показано, что соответствующий транскрипт длиной порядка 2500 нуклеотидов исчезает при повышении концентрации рибофлавина параллельно с основным транскриптом оперона [109]. Относительно промотора P3, расположенного перед геном *ribT*, на основании результатов гибридных экспериментов можно сказать только то, что, судя по интенсивности контролируемого им транскрипта длиной около 500 н, он по силе не уступает промотору P1 и не регулируется флавином [109]. При этом следует указать, что функция белка *ribT* в экспериментах *in vitro* до сих пор не установлена, однако в работе Перкинса с соавторами [110] было показано, что инактивация гена *ribT* не приводит к ауксотрофии по рибофлавинолу, но существенно снижает выход рибофлавина у штаммов-продуцентов. Из этого следует, что функция гена *ribT* в какой-то степени является лимитирующей при предельном повышении интенсивности биосинтеза рибофлавина.

Эта глава будет посвящена определению структуры внутренних промоторов *rib*-оперона, а также установлению особенностей их функциональной активности.

4.1. Определение старта транскрипции внутренних промоторов P2 и P3 *rib*-оперона

Чтобы однозначно определить последовательности промоторов P2 и P3 мы использовали метод удлинения праймера, который позволяет выявить старт транскрипции прилегающих генов. Суть этого метода заключается в том, что в результате обратной транскрипции специфический олигонуклеотид отжигается на соответствующей мРНК, и достраивается до 5'-конца этой мРНК. Результаты экспериментов представлены на рис 16.

Как следует из рис 16Б, основным старт транскрипции промотора P2 соответствует основанию Т, хотя имеются минорные сигналы как до, так и

после этого нуклеотида. Из этого следует, что наиболее вероятной структурой промотора P2 является последовательность TTGAAG (-35 область) и ТАСТАТ (-10 область) разделенная спейсером длиной 17 н.п. Расстояние между стартом транскрипции промотора P2 и иницирующим кодоном гена *ribA* составляет 296 пн.

16А

```

2581      2591      2601      2611      2621      2631      2641
ribB      R F G G H F V S G H V D G T A E I T R I
cgtttcggaggccatcttcgtctcaggccatgtcgcacggaactgcggaaatcacacgaaTT
gcaaaagcctccggtaaagcagagtcgggtacagctgccttgacgccttttagtgtgcttaa

2641      2651      2661      2671      2681      2691      2701
E E K S N A V Y Y D L K M D P S L T K T
-35                -10      +1
GAAGagaaaagcaacgcagttТАСТАТgatttaaaaatggaccgcgcattaacaaaaaca
cttctcttttcggttgctcaaatgatactaaatttttacctgggcagtaattgtttttgt

2701      2711      2721      2731      2741      2751      2761
L V L K G S I T V D G V S L T I F G L T
ttggtttttaaagggatcaattactgtggatggcgtgagcttaaccatattcggcctgaca
aaccaaaatttcctagttaatgacacctaccgcactcgaaattggtataagccggactgt
                                                    ribA103

```

16Б

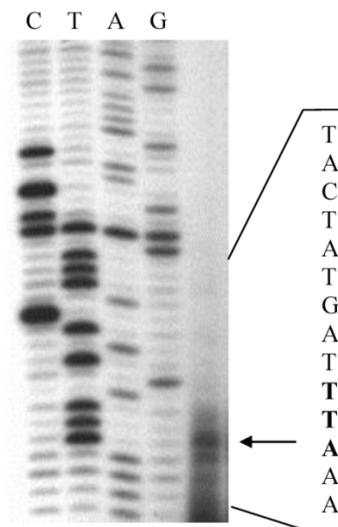
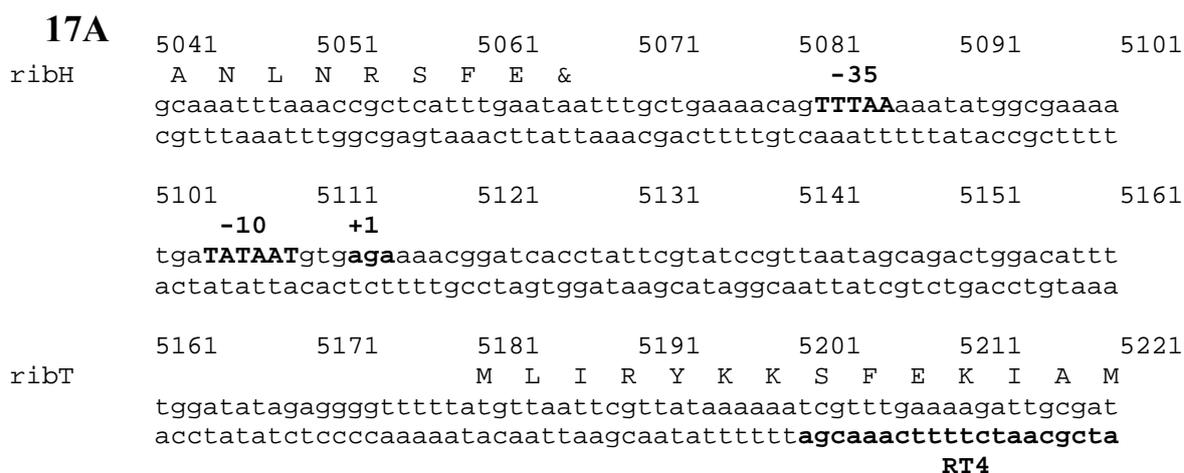


Рисунок 16. Определение старта транскрипции внутреннего промотора P2 *rib*-оперона. (А). Фрагмент нуклеотидной последовательности *rib*-оперона. Заглавными буквами обозначены характерные -35 и -10 последовательности промотора P2. **(Б).** Определение расположения сайта инициации транскрипции методом «удлинения праймера» с промотора P2 с использованием ^{32}P -меченного праймера *ribA103*. Справа показаны последовательности нуклеотидов, окружающий соответствующий старт транскрипции (выделено жирным шрифтом).

Данные, представленные на рис. 17 показывают, что инициация транскрипции с промотора P3 происходит примерно с одинаковой

эффективностью с трех нуклеотидов. Следует отметить, что использование нескольких нуклеотидов в качестве старта транскрипции для ряда промоторов описано в литературе [7; 66]. На основании этих данных наиболее вероятная структура промотора P3 представляет собой последовательность ТТТААА –спейсер 16 н.п.-ТАТААТ. Расстояние между стартом транскрипции промотора P3 и иницирующим кодоном гена *ribT* составляет 66 пн.



17Б

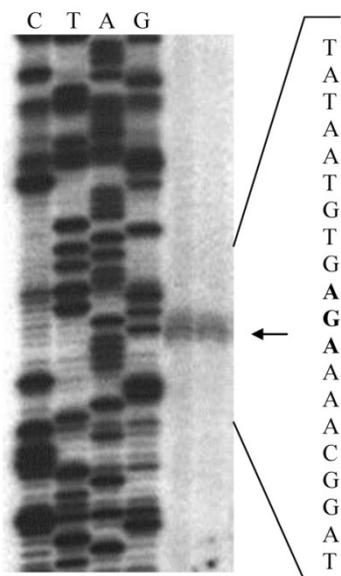


Рисунок 17. Определение старта транскрипции внутреннего промотора P3 *rib*-оперона. (А). Фрагмент нуклеотидной последовательности *rib*-оперона. Заглавными буквами обозначены характерные -35 и -10 последовательности промотора P3. **(Б).** Определение расположения сайта инициации транскрипции методом «удлинения праймера» с промотора P3 с использованием ³²P-меченного праймера RT4. Справа показаны последовательности нуклеотидов, окружающих соответствующий старт транскрипции (выделено жирным шрифтом).

4.2. Оценка силы промоторов *rib*-оперона

После определения структуры промоторов P2 и P3 представлялось интересным выяснить вклад каждого из них в уровень транскрипции соответствующих генов, а также установить, оказывают ли регуляторное влияние флавины на транскрипцию, осуществляемую с этих промоторов. 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 β -галактозидазы (рис. 18).

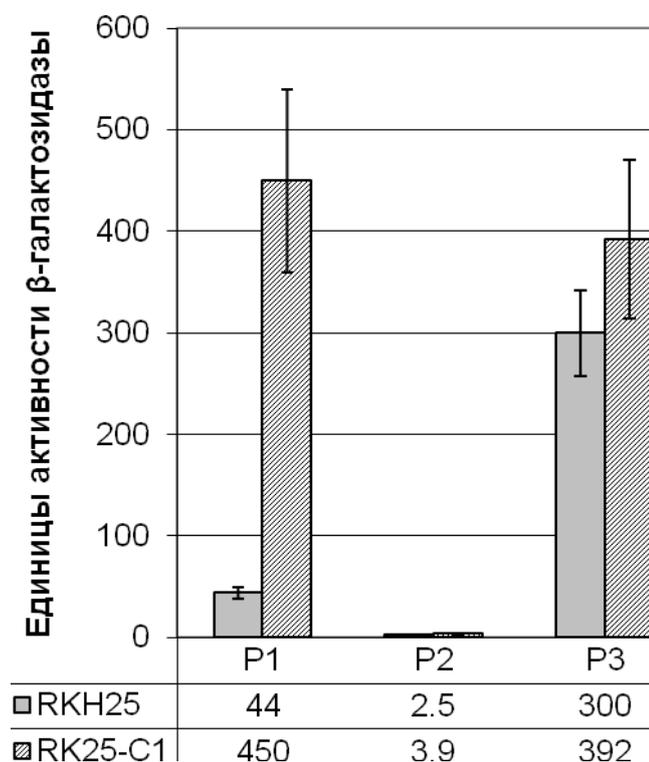


Рисунок 18. Оценка силы промоторов P1, P2 и P3 *rib*-оперона. Высота столбцов соответствует уровню β -галактозидазной активности, выраженной в единицах Миллера, для транскрипционных фьюзов *ribP₁₋₃-lacZ*, интегрированных в амилазный локус хромосомы штаммов-реципиентов дикого типа RKH25 и его изогенного варианта RK25-C1, содержащего мутацию в гене *ribC*, которая нарушает синтез эндогенного ФМН.

На основании сравнения уровней экспрессии β -галактозидазы у транскрипционных фьюзов *ribP₁₋₃-lacZ* в клетках штамма дикого типа RKN25 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.

Сравнение уровня активности β -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. 18 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.

4.3. Определение уровня транскрипции генов *ribB*, *ribA* и *ribT* в составе *rib*-оперона

Для изучения характера регуляции экспрессии генов *rib*-оперона в составе хромосомы мы сконструировали транскрипционные фьюзы на основе плазмиды pMutin2. Такая плазида содержит репортерный ген *lacZ* без собственного промотора, а также позволяет осуществлять направленную интеграцию конструкций в определенную область генома *B.subtilis*. Путем клонирования соответствующих участков *rib*-оперона в плазмиду pMutin2 и ее последующей интеграции в хромосому, были получены транскрипционные фьюзы, локализованные в генах *ribB*, *ribA* и *ribT*. В качестве реципиентов были использованы штаммы *B. subtilis* RKN25 и RK25-C1. Результаты экспериментов по определению активности β -галактозидазы у полученных штаммов представлены на рис 19.

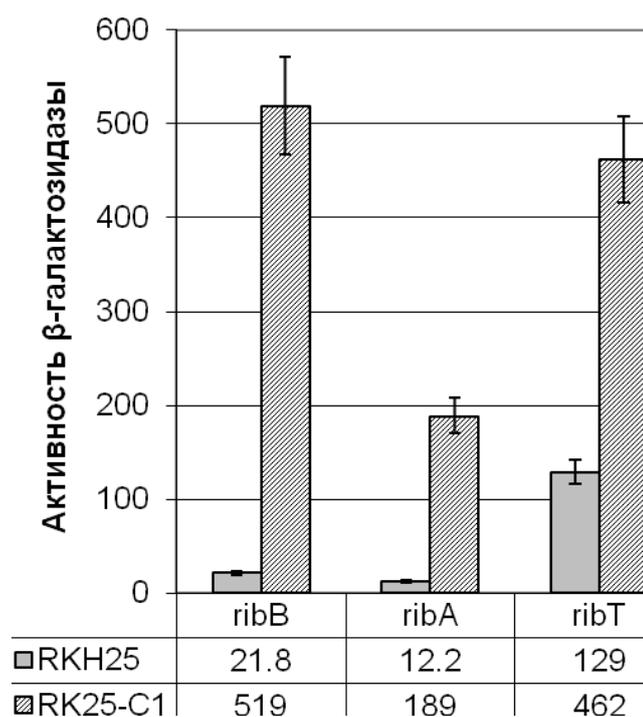


Рисунок 19. Сравнение уровня активности β -галактозидазы у транскрипционных фьюзов *ribB-lacZ*, *ribA-lacZ* и *ribT-lacZ*, интегрированных в *rib*-оперон в зависимости от аллельного состояния гена *ribC*.

Следует отметить, что интеграция плазмиды в структурные гены *ribB* и *ribA* приводит к появлению ауксотрофности по рибофлавину у штаммов-реципиентов, в то время как интеграция в ген *ribT* к таким изменениям не приводит. Кроме того, у штамма SSC127, содержащего инсерцию *ribT::mutin2* несмотря на присутствие мутации *ribC1* заметно снижается накопление рибофлавина в ростовой среде по сравнению с исходным штаммом, не содержащим инсерцию *ribT::mutin2*. Об этом свидетельствует существенное ослабление желтой окраски ореола вокруг колоний этого штамма на LB-среде.

Как показывают данные, представленные на рис.19, в клетках штамма дикого типа обнаруживаются довольно низкие значения активности β -галактозидазы у транскрипционных фьюзов *ribB::lacZ* и *ribA::lacZ*, что согласуется с полученными ранее данными о наличии негативной ФМН-зависимой регуляции основного промотора P1 с участием рибопереключателю [99]. Более высокий базальный уровень экспрессии β -

галактозидазы у штамма SS135, содержащего инсерцию *ribT::lacZ*, по-видимому, обусловлен активностью внутреннего промотора P3, на который флавины влияния не оказывают. На фоне мутации *ribC1*, предотвращающей образование ФМН в клетке, наблюдается резкое повышение активности β -галактозидазы во всех трех рассматриваемых фьюзах: *ribB* - в 24 раза, *ribA* - в 15,5 раз а *ribT* - 3,6 раза. Следует отметить, что ярко выраженный градиент в уровне экспрессии исследуемых генов вероятней всего обусловлен классическим полярным эффектом, характерным для полицистронных оперонов.

Данные, представленные на рис. 19, позволяют сделать заключение, что главную роль в регуляции экспрессии генов *rib*-оперона играет основной промотор P1, чувствительный к ФМН. Известно, что подавление экспрессии генов *rib*-оперона, опосредованное взаимодействием специфического рибопереключателя и ФМН, происходит на уровне терминации транскрипции [99]. Как было показано выше, внутренний промотор P2 отличается крайне низкой способностью инициировать транскрипцию, и поэтому вклад в общую транскрипцию *ribA*, *ribH* и *ribT* генов *rib*-оперона должен быть небольшим. В то же время, на основе данных по транскрипционным фьюзам для P2 нельзя определенно сказать о влиянии флавинов на этот промотор. Транскрипционная активность внутреннего промотора P3 довольно высокая, однако и в этом случае трудно сделать заключение о зависимости его регуляции от флавинов.

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

Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли P2 и P3 промоторы флавин-регулируемыми, мы использовали 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.

Поскольку транскрипция генов *ribA* и *ribT* с промоторов P1, P2 и P3 перекрывается, необходимо было прервать транскрипцию с основного промотора P1 и, таким образом, исключить его влияние на внутренние промоторы P2 и P3. Поэтому для этого эксперимента мы использовали суммарную РНК, выделенную из ранее полученной пары изогенных штаммов (SS131 *ribC*⁺ и SSC133 *ribC1*), содержащих инсерцию *ribB::Mutin2*. У этих штаммов транскрипция с P1 прерывается на Rho-независимом терминаторе, который находится в составе плазмиды *pMutin2* и расположен перед внутренним промотором P2. В качестве контроля мы провели RT-qPCR для штаммов *B. subtilis* RKN25 (*ribC*⁺) и RKN25-C1 (*ribC1*), чтобы оценить уровень экспрессии генов *rib*-оперона в условиях, когда транскрипция с промотора P1 не нарушена.

Результаты контрольного эксперимента представлены на рисунке 20. С помощью графика накопления флуоресцентного сигнала (рис. 20А) мы можем оценить фактический уровень транскрипции структурных генов. Чем левее расположена кривая на графике, тем выше уровень соответствующего транскрипта. В случае штамма дикого типа (кривые серого цвета на графике 20А) самый высокий уровень транскрипции соответствует гену *ribT*, затем генов *ribG* и *RibA*, и самое низкое количество транскрипта наблюдается для гена *ribB*. В клетках штамма RKN25-C1, у которого нарушен синтез эндогенного ФМН, транскрипция всех структурных генов возрастает и становится практически одинаковой.

Специальным программным обеспечением, поставляемым в комплекте к прибору, и в основе которого заложен метод стандартных кривых, был определен относительный уровень экспрессии для генов *ribG*, *ribB*, *ribA* и *ribT* *rib*-оперона (рис. 20Б). По сравнению с клетками дикого типа, в клетках

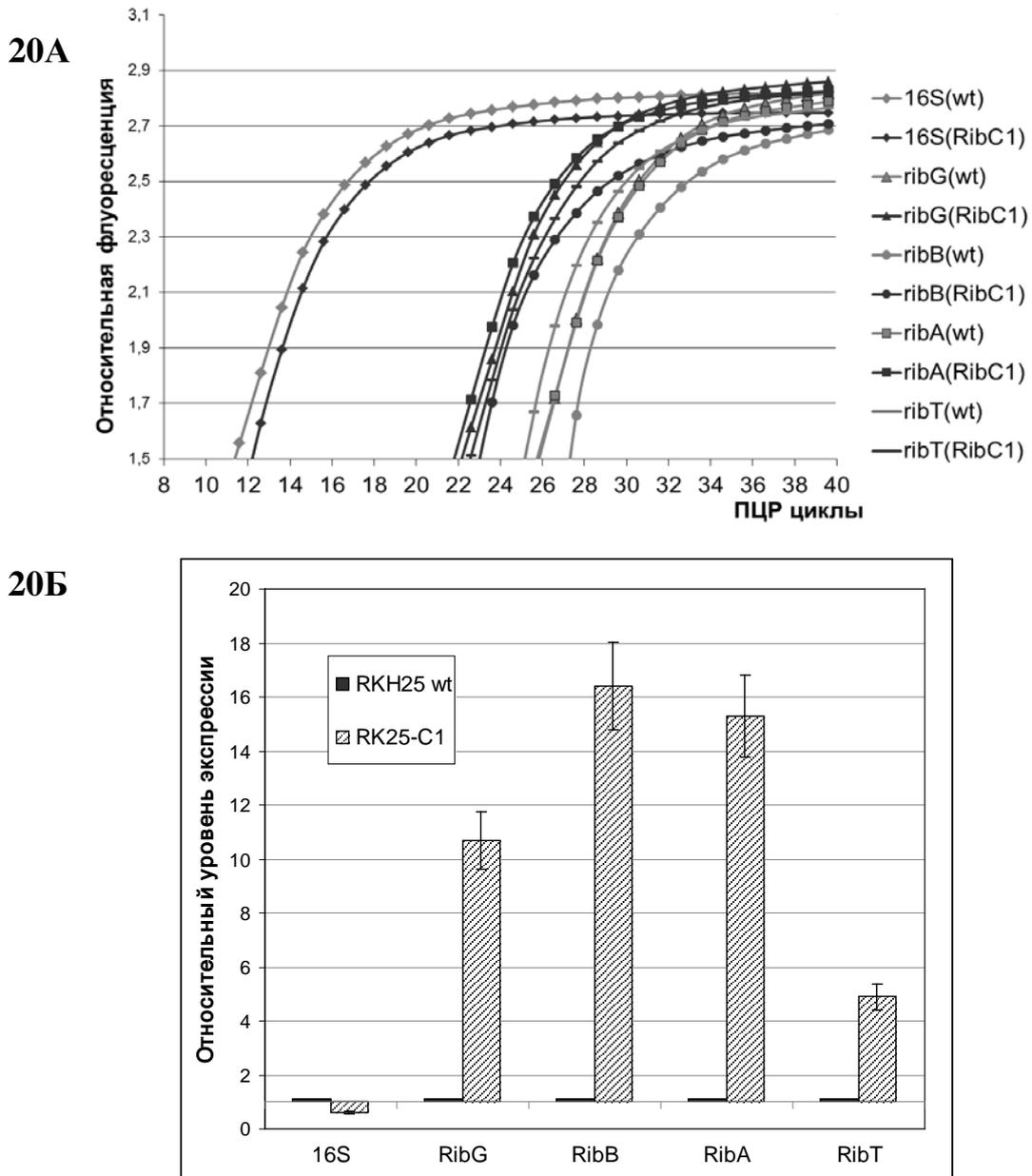


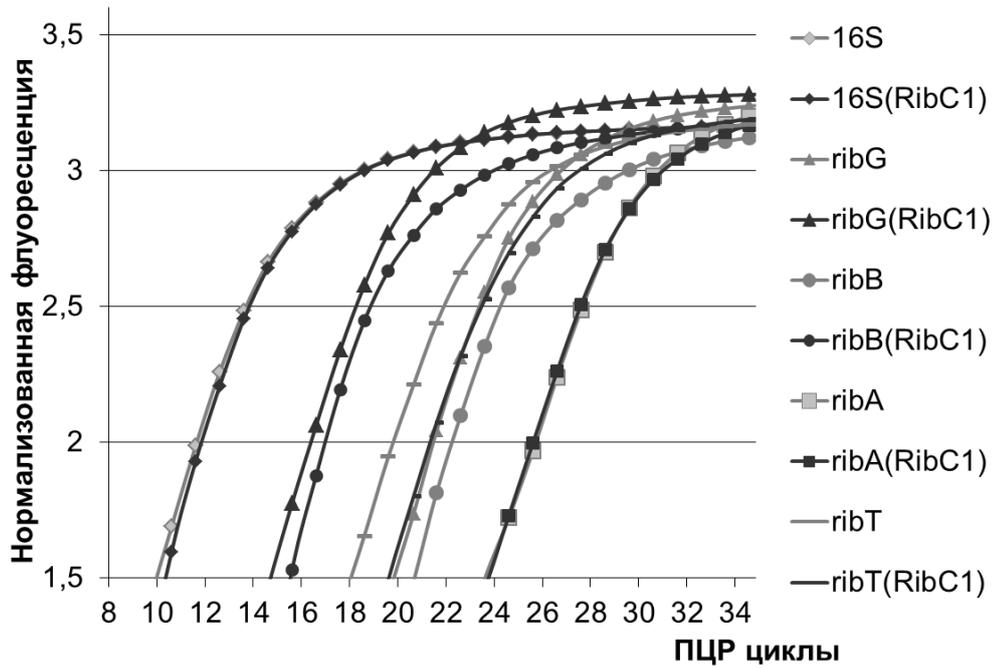
Рисунок 20. Определение уровня транскрипции генов *rib*-оперона с помощью RT-qPCR. Контрольный эксперимент. (А). График накопления флуоресцентного сигнала в логарифмических координатах в зависимости от ПЦР цикла. **(Б).** Относительный уровень экспрессии генов *ribG*, *ribB*, *ribA* и *ribT* *rib*-оперона для штаммов *B. subtilis* RKH25 (*ribC*⁺) и RK25-C1 (*ribC1*).

с мутацией *ribC1*, блокирующей синтез ФМН, наблюдается высокий уровень транскрипции всех генов *rib*-оперона. Так, уровень транскрипции гена *ribG* на фоне мутации *ribC1* повышается в 11 раз, *ribB* – в 17 раз, *ribA* – в 15 раз, и *ribT* – в 4,6 раза. Эти значения примерно соответствуют результатам оценки уровня экспрессии этих генов на основании определения активности β-галактозидазы у соответствующих транскрипционных фьюзов (рис.19).

На рис. 21 представлены результаты трех независимых опытов, отражающие влияние флавинов на промоторы *rib*-оперона. Как отмечалось ранее, у штаммов с инсерцией *ribB::Mutin2* происходит преждевременная терминация транскрипции с основного промотора P1 на Rho-независимом терминаторе, расположенном внутри интегрированной в ген *ribB* плазмиды pMutin2. Следовательно, у штаммов SS131 *ribC*⁺ и SSC133 *ribC1* 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*⁺ и SSC133 *ribC1* позволяет оценить наличие или отсутствие флавин-зависимой регуляции внутренних промоторов P2 и P3.

На фоне мутации *ribC1* в клетках штамма SSC133 по сравнению с клетками штамма SS131, которые этой мутации не содержат, мы наблюдаем высокий уровень транскрипции только двух генов – *ribG* (в 35 раз) и *ribB* (в 45 раз). Более высокий уровень дерепрессии этих генов по сравнению с контрольными штаммами (рис. 19), по-видимому, объясняется тем, что штаммы с инсерцией *ribB::Mutin2* являются ауксотрофами по рибофлавиону в результате чего в клетках этих штаммов пул эндогенных производных рибофлавина существенно ниже, чем у прототрофных по рибофлавиону штаммов. Что касается генов *ribA* и *ribT*, то под действием мутации *ribC1* относительный уровень экспрессии этих генов не изменяется (рис. 21). 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.

21А



21Б

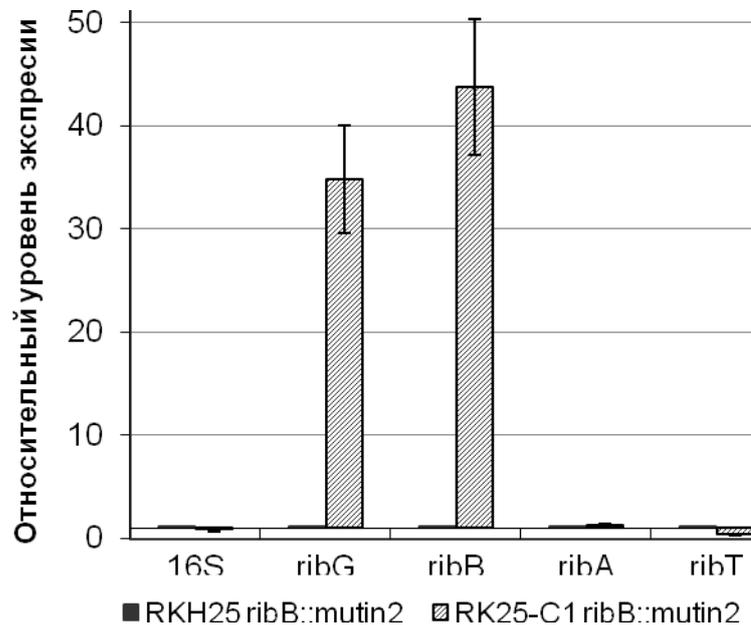


Рисунок 21. Оценка влияния флавинов на промоторы *rib*-оперона с помощью RT-qPCR. (А) График накопления флуоресцентного сигнала в логарифмических координатах в зависимости от ПЦР цикла. (Б). Относительный уровень экспрессии генов *rib*-оперона для пары изогенных штаммов, содержащих инсерцию *ribB::Mutin2* (SS131 *ribC*⁺ и SSC133 *ribC1*). Изменение экспрессии генов *ribG* и *ribB* на фоне мутации *ribC1* у штаммов с инсерцией *ribB::Mutin2* отражает характер влияния флавинов на промотор P1, гена *ribA* - на промотор P2, гена *ribT* - на промотор P2 и P3 (объяснение в тексте).

В итоге проведенной работы нами установлена структура внутренних промоторов P2 и P3 *rib*-оперона *B.subtilis*, определена транскрипционная активность этих промоторов и представлены доказательства, что активность обоих промоторов P2 и P3 не подвержена регуляции с участием флавинов. Особого обсуждения требует топология промотора P2. Во-первых, необычно сама локализация этого промотора – в транслируемой области гена *ribB*. Такое расположение лишает его возможности в процессе эволюции менять свою структуру, не повреждая при этом аминокислотный состав рибофлавинсинтазы – белка, кодируемого геном *ribB*. Во-вторых, обращает на себя внимание необычно большое расстояние (296 пн) между стартом транскрипции промотора P2 и иницирующим трансляцию кодоном ближайшего структурного гена *ribA*. Наконец, эта протяженная область между стартами транскрипции и трансляции содержит несколько блоков из палиндромных последовательностей, способных формировать шпилечные структуры – потенциальные мишени для гипотетических транскрипционных регуляторов. Из полученных нами данных следует, что промотор P2 не регулируется флавинами и не оказывает существенного влияния на общую экспрессию дистальных генов *rib*-оперона ввиду его слабой транскрипционной активности. Однако, эти результаты не исключают возможности наличия дополнительных механизмов регуляции транскрипции промотора P2. В пользу такого предположения могут свидетельствовать данные полученные при изучении биосинтеза рибофлавина у *E.coli*, где ген ГТФ-циклогидролазы *ribA* регулируется транскрипционным регулятором белком SoxS и активируется в условиях оксидативного стресса [74]. Согласно полученным нами предварительным данным экспрессия промотора P2 увеличивается примерно в 2 раза в присутствии параквата – метаболита, вызывающего оксидативный стресс, однако механизм действия параквата на экспрессию промотора P2 непонятен и требует дальнейших исследований.

Что касается промотора P3, то согласно полученным нами данным его транскрипционная активность сравнима с активностью основного промотора

оперона P1, однако, как и активность промотора P2, не регулируется флавинами. Тем не менее, как и в случае с промотором P2, мы не можем сделать окончательного вывода о том, что активность промотора P3 не подвержена какой-либо дополнительной регуляции. Потенциальный эффектор регуляции этого промотора может быть связан с характером ферментативной активности белка *ribT*.

Важно подчеркнуть, что белок, кодируемый геном *ribT* под контролем промотора P3, непосредственно не участвует в биосинтезе рибофлавина и его функция в клетке до сих пор остается неизвестной. Поиск гомологов белка RibT по банку данных NCBI (National Collection of Biological Information) не позволил сделать однозначного заключения: среди почти 150 обнаруженных гомологов (в основном гипотетических белков) обнаруживается частичная гомология с двумя классами ферментов: редуктазами и ацетилтрансферазами. Роль редуктазы в биосинтезе рибофлавина не вызывает сомнения – одним из необходимых этапов биосинтеза рибофлавина является восстановление рибозила в рибитил. Функция ацетилтрансфераз в биосинтезе рибофлавина менее очевидна, но можно, например, предположить наличие у белка *ribT* способности переносить ацетильную группу на N₅ атом флавинов, что приводит к образованию восстановленных форм. Применительно к рибофлавинолу известна реакция восстановительного ацетилирования именно N₅-атома [1]. Если таковая функция у белка *ribT* существует, то инактивация гена *ribT* может понизить в клетке долю восстановленных форм, а так как к взаимодействию с *rfn*-элементом рибопереключателея способна именно окисленная форма ФМН, это может привести к ослаблению экспрессии рибофлавинового оперона, что и происходит на деле в случае штаммов-продуцентов рибофлавина. Во всяком случае, очевидно, что без окончательной идентификации продукта гена *ribT* наши знания о функционировании *rib*-оперона никогда не будут исчерпывающими.

5. 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 экспериментально результатами генетического и биохимического анализа [5]. Затем было показано, что рибофлавиновый транспортер, кодируемый геном *uraA*, содержит пять трансмембранных доменов и его С-концевая часть располагается в цитоплазме [143]. Выяснилось, что транслокация субстрата белком-транспортером *UraA* происходит с затратами энергии и негативно регулируется флавинами [108].

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 [51; 141]. Как упоминалось в предыдущей главе, подобный *rfn*-элемент, расположен в 5'-нетранслируемой области *rib*-оперона *B.subtilis*, и является специфическим сайтом связывания для флавинмононуклеотида (ФМН) [99]. В случае *rib*-оперона связывание ФМН с *rfn*-элементом приводит к такому изменению конформации лидерной РНК, которое обуславливает формирование терминатора транскрипции и прерывает считывание структурных генов оперона [99; 155]. На основании структурно-функционального анализа *rfn*-элемента гена *uraA* методом гидролиза РНК [155] была предложена модель, согласно которой регуляция этого гена осуществляется не на уровне терминации транскрипции, 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 [155] получено не было.

5.1. Определение структуры промотора гена *uraA* *B.subtilis*

Первым шагом в изучении регуляции гена *uraA* было установление структуры его промотора с помощью метода удлинения праймера. Результаты эксперимента представлены на рисунке 22. Старт транскрипции гена *uraA*, как следует из рис. 22Б, соответствует основанию А. Следовательно, наиболее вероятной структурой промотора является ТАТАСА (-35 последовательность) и ТАТААТ (-10 последовательность), разделенные спейсером в 17 нп. Расстояние от старта транскрипции до иницирующего кодона GUG (V) составляет 300нп.

22А

```

241      251      261      271      281      291      301
                               -35
ctgacagcttgcaggtaatatatttaattgaagcaattctcТАТАСАgccaaccagtta
gactgtcgaacgtccattatataaaacttcgttaagagatatgtcggttggtcaat

301      311      321      331      341      351      361
      -10      +1
tcggttТАТААТgtaattаaatttcataatgatcaatcttcggggcagggtgaaattcccta
agcaaatattacattaatttaaagtatactagttagаagccccgtcccaactttaagggat
                                         Y10

```

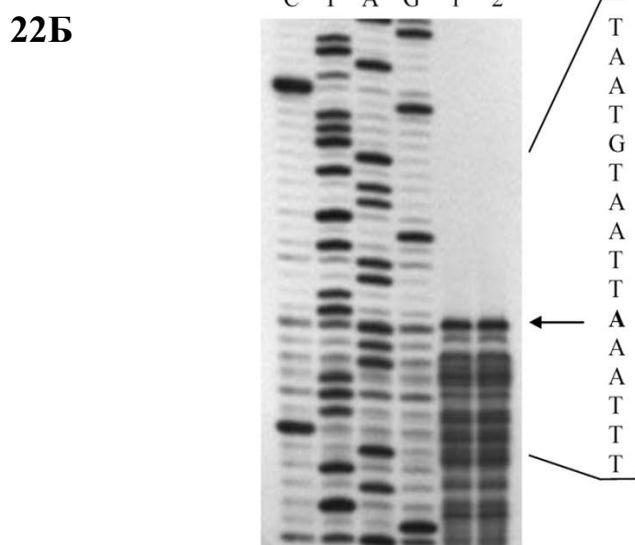


Рисунок 22. Определение структуры промотора гена *uraA*. (А) Фрагмент нуклеотидной последовательности гена *uraA*. Заглавными буквами обозначены характерные -35 и -10 последовательности промотора. (Б). Определение расположения сайта инициации транскрипции методом удлинения праймера с использованием 32 P-меченного праймера Y10. Нумерация дорожек 1 и 2 на рисунке соответствует различным экспериментам, для которых были использованы препараты суммарных РНК, выделенных из штаммов *B. subtilis* RKH25 и его изогенного варианта *B. subtilis* RKH25-C1 соответственно. Вертикально справа показана последовательность нуклеотидов, окружающих соответствующий старт транскрипции.

5.2. 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* (рис. 23), основанной на изменении конформации рибопереключател, был проведен сайт-направленный мутагенез лидерной области гена *uraA*. С помощью ПЦР и специфических олигонуклеотидов YM5 и YM17, YM11 и YM23, содержащие определенные нуклеотидные замены, были введены мутации в лидерную область M5, M11 соответственно. Получение делеционного мутанта, у которого удалена аптамерная часть (*rfn*-элемент), осуществлялось методом ПЦР с использованием пары праймеров YM27 и YM29. Расположение всех полученных мутаций показано на рисунке 23А.

Соответствующие нуклеотидные замены были выбраны для исследования на основе данных рентгеноструктурного анализа комплекса ФМН с лидерной мРНК для *F. nucleatum* [127]. Так, мутация M5 (G95→A), расположенная в аптамерной части ФМН-зависимого рибопереключател, 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 (Δrfn) должна приводить к конститутивной экспрессии гена *uraA* с потерей чувствительности к ФМН.

Чтобы оценить эффект полученных мутаций, мы сконструировали транскрипционные и трансляционные фьюзы лидерной области гена *uraA* дикого типа и ее мутантных вариантов с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора. Для этого проводили ПЦР-амплификацию соответствующих фрагментов лидерной области гена *uraA*, включающие промотор, с помощью прямого Y1 и обратного Y2 праймеров. Далее полученные фрагменты делеционного мутанта и M11 клонировали в экспрессионные интегративные вектора pDG268 и pDG246 по сайтам

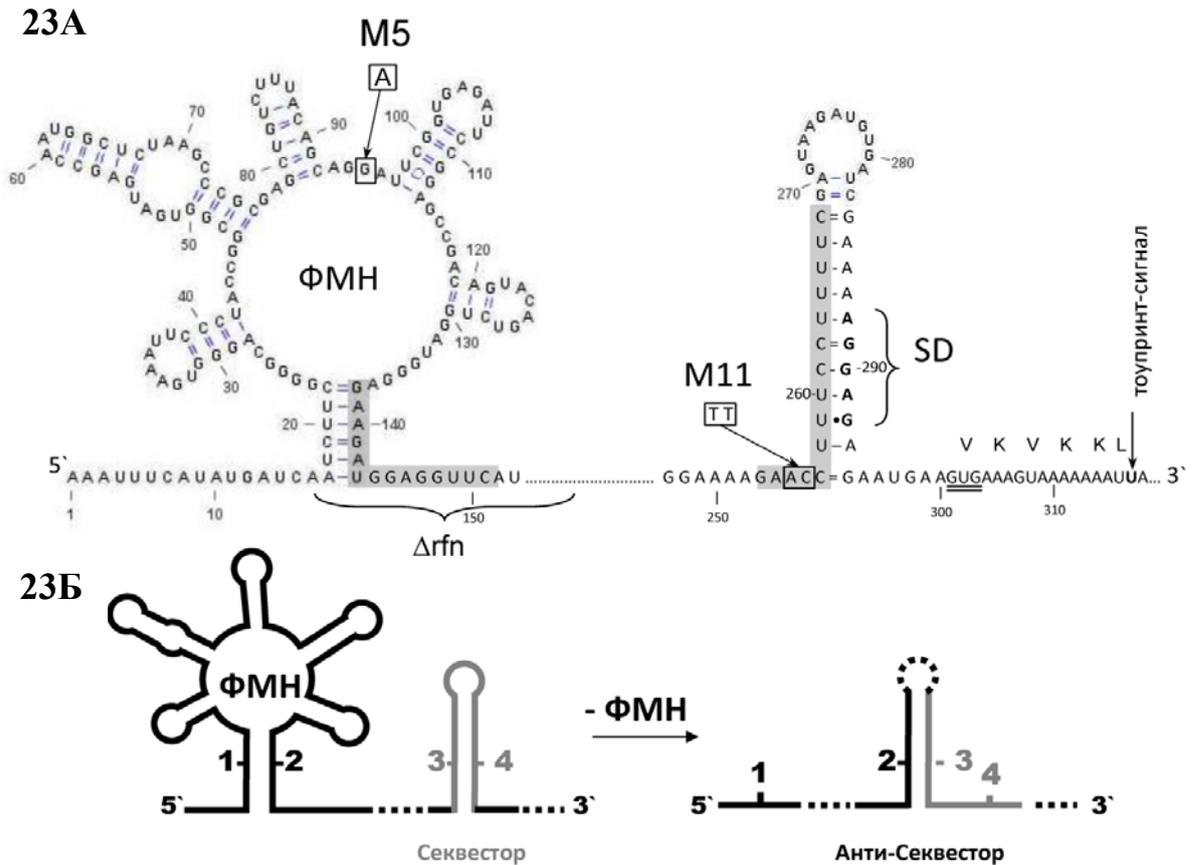


Рисунок 23. Модель регуляции гена *uraA* *B. subtilis*. (А). Модель вторичной структуры *uraA*-мРНК в результате взаимодействия с ФМН. Последовательность SD выделена жирным шрифтом и обозначена фигурной скобкой. Нуклеотиды, формирующие альтернативную структуру в отсутствие ФМН (анти-секвестор) выделены серым цветом. Положение нуклеотидных замен у мутантов M5 и M11 обозначено рамкой, делеционный мутант Δrfn обозначен фигурной скобкой. Триплет, кодирующий стартовую аминокислоту в процессе трансляции, выделен двойным подчеркиванием. Положение тоупринт-сигнала обозначено жирным шрифтом и стрелкой. (Б). Модель регуляции гена *uraA* *B. subtilis* ФМН-зависимого рибопереклювателя.

узнавания рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*, и мутант M5 по сайтам узнавания рестриктаз *SmaI* и *BamHI* (поскольку вследствие такой нуклеотидной замены в лидерной области возникает сайт узнавания рестриктазы *EcoRI*). В результате получали транскрипционные и трансляционные фьюзы *uraA-lacZ* соответственно. Затем плазмиды со вставками были интегрированы в хромосомный локус *amyE* двух изогенных штаммов *Bacillus subtilis* RKN25 дикого типа и *Bacillus subtilis* RKN25-C1, у которого мутация *ribC1* нарушает синтез эндогенного ФМН [24]. Для определения активности β -галактозидазы, полученные штаммы RKN25 *amyE::uraA-lacZ* и RKN25-C1 *amyE::uraA-lacZ* выращивали на полноценной среде LB до средней

экспоненциальной фазы роста при 37°C. Сравнение значений активности β -галактозидазы для этой пары штаммов, выращенных в одинаковых условиях позволяет оценить влияние эндогенного ФМН, накапливаемого в штамме дикого типа на экспрессию гена *uraA*. Результаты эксперимента приведены в таблице 5.

Таблица 5*

Влияние ФМН на экспрессию транскрипционных и трансляционных фьюзов *uraA-LacZ*, содержащих лидерную область гена *uraA* *B. subtilis* дикого типа и ее мутантные варианты.

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
Δ rfn	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 $OD_{600}=0.5-0.6$. 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.

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 (таблица 5). Такие 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*. Так, значение активности β -галактозидазы для транскрипционного фьюза с мутацией M5, локализованного в штамме RKH25, (880 ед. по Миллеру) становится практически равным значению активности для транскрипционного фьюза с лидерной областью дикого типа в случае реципиентного штамма RKH25-C1 (737 ед. по Миллеру). Такой

результат свидетельствует о том, что мутация M5 отменяет негативный эффект ФМН на экспрессию гена *uraA*. Как отмечалось выше, действие мутации M5 можно объяснить, основываясь на данных рентгеноструктурного анализа комплекса ФМН с лидерной мРНК [127]. Нуклеотидная замена G95→A, расположенная в ФМН-связывающем кармане лидерной мРНК, нарушает взаимодействие *rfn*-элемента с фосфатной группой молекулы ФМН.

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 RKN25), так и в отсутствии (штамм RKN25-C1) эндогенного ФМН. В случае транскрипционных фьюзов, содержащих лидерную область с мутацией M11, значения активности β-галактозидазы также снижаются. По-видимому, неэффективная трансляция в этом случае сказывается на транскрипции репортерного гена, более того, усиленная секвесторная шпилька может служить препятствием для РНК-полимеразы и, как минимум, вызывать состояние паузы. Из этого следует, что формирование шпилечной структуры секвестора 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 отсутствие лиганда, и которые способствуют экспрессии прилегающих генов.

5.3. 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 [57]. 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). Для этого эксперимента были синтезированы мРНК с ДНК матрицы, содержащей лидерную область гена *uraA* дикого типа и мутантной матрицы M11 с заменами в области секвестра трансляции (рис. 23А). Результаты тоупринт-анализа представлены на рис. 24.

В отсутствие 30S субъединицы рибосомы, в процессе реакции обратной транскрипции происходит беспрепятственное удлинение праймера 246-4 на матрице *uraA*-мРНК дикого типа, о чем свидетельствует образование продуктов реакции размером, соответствующем остановке в положении U233 и G214 относительно старта транскрипции. Образование этих продуктов, по-видимому, обусловлено формированием шпилечных структур, реализующихся в процессе фолдинга лидерной мРНК. Преинкубация матрицы в присутствии 30S субъединицы и тРНК^{fMet}, но в отсутствии 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, 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^{fMet} 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

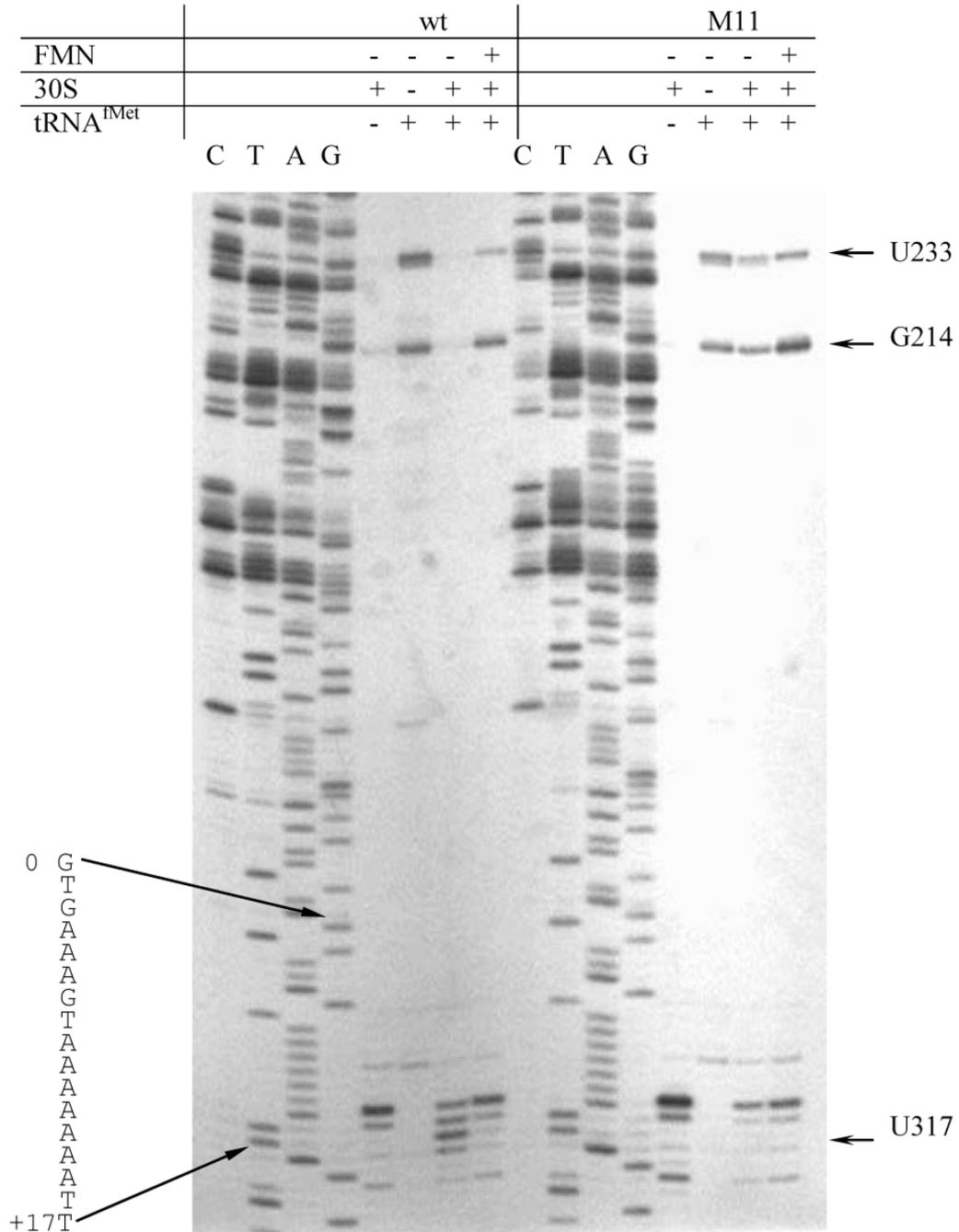


Рисунок 24. Влияние ФМН на формирование 30S инициаторного комплекса на *uraA*- мРНК дикого типа и содержащей мутацию M11. Стрелками слева показано положение G₀ и U₊₁₇ нуклеотидов. Стрелками справа указаны продукты реакции обратной транскрипции, размер которых соответствует остановке в соответствующем положении относительно старта транскрипции.

формирования шпилечной структуры секвестора (рис.23). Это заключение подтверждается результатами тоупринт-эксперимента с мутантной матрицей M11, которая содержит нуклеотидные замены, стабилизирующие шпильку секвестра трансляции. Как следует из данных, представленных на рис.24, образование продукта U317 вообще не происходит как в присутствии, так и в отсутствии ФМН. Из этого следует, что введение дополнительной пары нуклеотидов обеспечивающих увеличение области спаривания левого и правого плеча секвестра трансляции полностью препятствует связыванию 30S субъединицы рибосомы с SD-последовательностью.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что связывание ФМН с лидерной мРНК гена *uraA* приводит к образованию структуры секвестра трансляции 3-4 (обозначено серым цветом на рис. 23), блокирующего SD-последовательность, тогда как в отсутствии ФМН - формируется анти-секвестр 2-3, обеспечивающий возможность трансляции структурной части гена.

5.4. Транскрипция *in vitro* гена *uraA* на твердой фазе

На следующем этапе исследования нам представлялось интересным выяснить, оказывает ли влияние ФМН на транскрипцию гена *uraA*, поскольку данные *in vivo* (таблица 5) 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. В ходе эксперимента 5'-биотинилированная матрица ДНК Y1-Y2, содержащая фрагмент лидерной области гена *uraA* с нативным промотором, иммобилизовалась на авидиновых «шариках» (NeutroAvidin beads «Termo scientific»). В нуклеотидную цепь растущей РНК вблизи 5'-

конца была введена радиоактивная метка, внесенная при добавлении [α - ^{32}P]UTP в качестве субстрата в процессе формирования иницирующего элонгационного комплекса (ЭК), который был остановлен в положении +22 нуклеотида (см. материалы и методы). ЭК22 отмывали транскрипционным буфером и далее возобновляли реакцию транскрипции («chase») в присутствии либо нет 100 μM ФМН. После завершения реакции образцы делились на две части, одна из которых подвергалась серии отмывок для удаления продуктов терминации: сначала буфером с высоким содержанием соли, а затем дважды транскрипционным буфером. Анализ продуктов реакции в 8% ПААГ показывает (рис. 25), что добавление ФМН вызывает преждевременную терминацию транскрипции в положении, соответствующему 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.

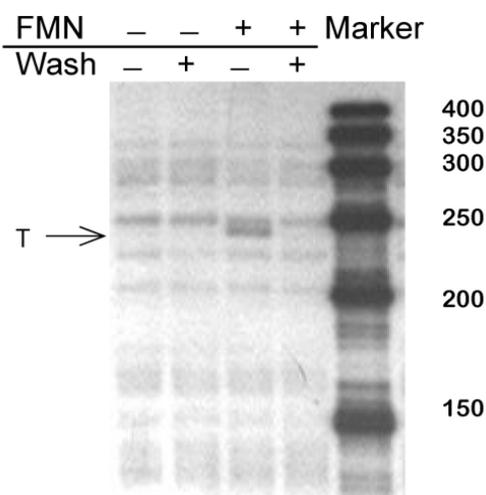


Рисунок 25. Терминация транскрипции *in vitro* гена *uraA* в зависимости от присутствия ФМН. Справа обозначен размер соответствующих транскриптов для РНК-маркера. Положение ФМН-зависимой терминации обозначено стрелкой.

Таким образом, в очищенной системе *in vitro* мы получили экспериментальное подтверждение ФМН-зависимой терминации транскрипции гена *uraA* и определили положение Rho-независимого терминатора в лидерной области.

5.5. Изучение экспрессии транскрипционных фьюзов *uraA-LacZ* в клетках штамма *B. subtilis RibB110*

На следующем этапе исследования, мы провели анализ нуклеотидной последовательности лидерной мРНК гена *uraA* и определили наиболее вероятную структуру Rho-независимого терминатора транскрипции (шпилька VIII на рис. 26), 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 M9 (C212→G; C213→G) и M10 (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*.

С этой целью был осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров YM9 (прямой) и YM21 (обратный) в случае мутанта M9, и YM10 (прямой) и YM22 (обратный) в случае мутанта M10, содержащих соответствующие нуклеотидные замены. На первом этапе провели наработку ПЦР-фрагментов Y1-YM21, Y1-YM22 (фланкируют 5'-конец гена *uraA* и содержат сайт узнавания для рестриктазы *EcoRI*) и YM9-Y2, YM10-Y2 (фланкируют 3'-конец гена *uraA* и содержат сайт узнавания для рестриктазы *BamHI*). Затем осуществили состыковку полученных фрагментов и провели наработку лидерной области *uraA* с участием пары праймеров Y1 и Y2. Далее осуществляли клонирование ПЦР-фрагментов Y1-Y2(M9) и Y1-Y2(M10) в вектор pDG268 с использованием рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* для получения транскрипционных фьюзов мутантной лидерной области гена *uraA* с геном *lacZ*. Чтобы сконструировать двойной мутант M9/10, для ПЦР в качестве ДНК-матрицы была использована плазида pDG268::Y1-Y2(M10), содержащая мутацию M10, а также две пары праймеров Y1 и YM21, YM9 и Y2. Далее с помощью ПЦР провели состыковку фрагментов Y1-YM21 и YM9-Y2 и наработали лидерную область гена *uraA*, содержащую двойную замену M9/10, по фланкирующим праймерам Y1 и Y2. Затем клонировали

полученный фрагмент в вектор pDG268 по сайтам узнавания рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*.

С использованием транскрипционных фьюзов *uraA-lacZ* нам представлялось интересным выяснить, какую роль в ФМН-зависимой регуляции транскрипции гена *uraA* играет целостность лидерной области. С этой целью с помощью ПЦР были получены 4 фрагмента различной протяженности: Y1-Y50, в состав которого входит только *rfn*-элемент (155 н. от старта транскрипции), Y1-Y51, который содержит также шпильку VII (рис. 26) (214 н. от старта транскрипции), Y1-Y52, нуклеотидная последовательность которого включает шпильку терминатора (256 н. от старта транскрипции), а также фрагмент полноразмерной лидерной области Y1-Y2. Полученные фрагменты клонировали в экспрессионный вектор pDG268 по сайтам узнавания рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*.

На заключительном этапе проведена интеграция всех полученных плазмид в хромосомный локус *amyE* штамма *B.subtilis ribB110*, у которого мутация в гене *ribB*, кодирующем один из ферментов биосинтеза рибофлавина, приводит к ауксотрофии по этому компоненту. Таким образом, мы могли моделировать два физиологических условия в клетке: дерепрессия на фоне отсутствия эндогенного ФМН, и репрессия – когда в ростовую среду добавляется рибофлавин, превращающийся в ФМН внутри клетки. Результаты опытов по измерению активности β -галактозидазы для транскрипционных фьюзов *uraA-lacZ* в штамме *B.subtilis RibB110* представлены в таблице 6.

В случае лидерной области, содержащей только аптамерную часть рибопереключателея, а именно *rfn*-элемент, наблюдается высокий уровень экспрессии репортерного гена независимо от ФМН. Из этого следует, что в отсутствие экспрессионной платформы связывание ФМН с аптамерным участком рибопереключателея не оказывает регуляторного влияния на инициацию транскрипции с нативного промотора гена *uraA*.

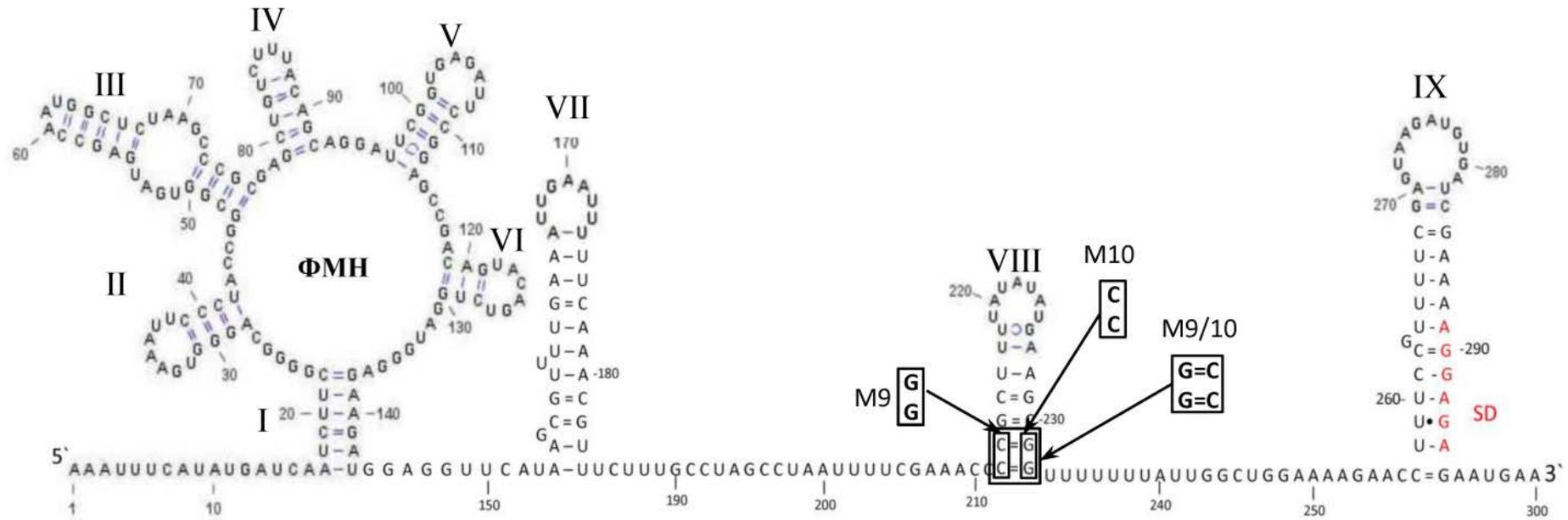


Рисунок 26. Модель вторичной структуры лидерной области гена *uraA* *B.subtilis* в присутствии ФМН.

Шпильчатые структуры пронумерованы римскими цифрами, шпилька VIII – соответствует терминатору транскрипции, шпилька IX – секвестору трансляции. Нуклеотидные замены выделены рамкой.

Таблица 6.

Влияние рибофлавина на экспрессию транскрипционных фьюзов *uraA-lacZ* в клетках штамма *B.subtilis RibB110*.

Мутант	Длина лидерной области от старта транскрипции, н	Активность β -галактозидазы		Репрессия
		-	Рибофлавин 50 μ М	
wt	155	348	294	1,2
wt	214	156	98	1,6
wt	256	141	37	3,8
wt	300	388	110	3,5
M9 C212→G; C213→G	300	405	342	1,2
M10 G231→C; G232→C	300	239	285	0,8
M9/10 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 μ М при выращивании ночной культуры, утром клетки отмывали и разбавляли в 25 раз свежей средой без рибофлавина и с добавлением 50 μ М 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.

Увеличение лидерной области до 214 нуклеотидов от старта транскрипции приводит к заметному снижению активности β -галактозидазы, однако чувствительность экспрессии данной конструкции к присутствию ФМН весьма незначительная. Наблюдаемое падение экспрессии репортерного гена, вероятнее всего, связано с действием шпильки VII (рис. 26), формирование которой, по-видимому, происходит независимо от ФМН. По своей архитектуре эта шпилька имеет протяженный стебель и сразу после нее следует несколько урациловых остатков. Мы предполагаем, что такая шпилька может служить препятствием для РНК-полимеразы и, как следствие, снижать долю целевого транскрипта. В то же время, в случае конструкции протяженностью 256 нуклеотидов, которая содержит шпильку VIII (рис.26) добавление рибофлавина в ростовую среду приводит к почти 4-х кратному снижению активности β -галактозидазы (табл. 6). В случае

полноразмерной лидерной области гена *uraA* в условиях дерепрессии наблюдаются высокие значения активности β -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 свидетельствуют 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 β -галактозидазы у транскрипционных фьюзов мутантных лидерных областей с геном *lacZ*. Так, у мутанта M9 и M10 наблюдаются высокие значения активности β -галактозидазы независимо от ФМН. Следовательно, дестабилизация терминаторной шпильки, вызванная внесением мутаций в левое и правое «плечо» шпильки VIII, соответственно (рис. 26), устраняет негативное влияние ФМН на транскрипцию гена *uraA*. В случае совмещения в одном геноме мутаций M9 и M10 (M9/10), комбинация которых восстанавливает целостность терминаторной шпильки, экспрессия реперного гена не достигает уровня дикого типа, однако чувствительность к действию ФМН восстанавливается. По-видимому, значения активности β -галактозидазы в условиях дерепрессии у такого мутанта являются заниженными ввиду того, что введение нуклеотидных замен может отрицательно сказываться на формировании анти-терминатора.

5.6. 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. Результаты эксперимента представлены на рисунке 27.

Как следует из данных, представленных на рис. 27, в случае матрицы штамма дикого типа добавление ФМН в транскрипционную смесь приводит к формированию четко выраженного сигнала размером ~240 нуклеотидов. У мутанта M9, содержащего нуклеотидные замены, приводящие к разрушению терминаторной шпильки полоса длиной 240 нуклеотидов, соответствующая преждевременной терминации, исчезает независимо от присутствия ФМН. У двойного мутанта M9/10, восстанавливающего целостность терминаторной шпильки VIII (рис. 23), 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 M11, содержащего нуклеотидные замены в области секвестора трансляции (рис. 22А) эффективность преждевременной терминации транскрипции неотличима от дикого типа.

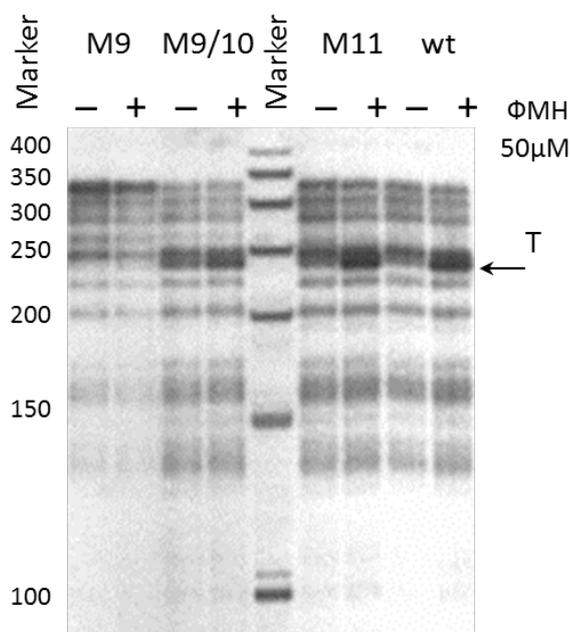


Рисунок 27. Транскрипция *in vitro* лидерной области гена *uraA* дикого типа и ее мутантных вариантов в зависимости от присутствия ФМН. Слева от рисунка указан размер соответствующих транскриптов для РНК-маркера. Положение ФМН-зависимой терминации обозначено стрелкой.

Все полученные результаты согласуются с данными для транскрипционных фьюзов *uraA-lacZ in vivo*, которые подробно рассматривались в предыдущем разделе.

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

Чтобы уточнить модель регуляции гена *uraA* с участием ФМН-связывающего рибопереключателя, 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. Для этого эксперимента сначала были получены ДНК-матрицы, содержащие фрагменты лидерной области гена *uraA* разной длины под контролем промотора фага T7. Далее с помощью транскрипции *in vitro* были синтезированы соответствующие лидерные мРНК, размер которых составил 240 и 380 нуклеотидов. Полученная РНК подвергалась стадии дефосфорилирования и затем кинированию, в результате которого происходил перенос фосфатной группы с [γ - 32 P] АТФ на 5'-конец лидерных мРНК. Меченая РНК инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 часов в присутствии 100 μ M ФМН, либо в его отсутствии. Анализ продуктов реакции спонтанного расщепления проводили в денатурирующем 8% ПААГ. Чтобы идентифицировать соответствующие продукты реакции, меченая РНК подвергалась щелочному гидролизу, а также специфическому расщеплению РНКазой T1, которая разрезает РНК после остатков гуанина.

На рисунке 28А представлен опыт по гидролизу лидерной мРНК размером 380 нуклеотидов. Как следует из данных рис. 28А, в области сайта

связывания рибосомы (SD) обнаруживаются значительные структурные изменения в профиле гидролиза РНК в зависимости 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 шпилечной структуры IX секвестра (рис. 29). 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. Полученные данные позволяют заключить, что ФМН блокирует трансляцию в результате формирования шпильки секвестра, тогда как в отсутствие ФМН реализуется альтернативная структура – анти-секвестр, наиболее вероятная последовательность которого обозначена на рисунке 29. Еще один участок повышенной чувствительности к гидролизу в отсутствие ФМН обнаружен в районе 94-95 нуклеотидов, что может свидетельствовать об экранирующем действии ФМН на этот участок при его связывании с аптамером. Следует отметить, что исследуемый нами профиль гидролиза не выявляет какой-либо зависимости от ФМН в районе локализации предполагаемого терминатора транскрипции (нуклеотиды 210-240). Мы предположили, что участки анти-секвестра и анти-терминатора могут перекрываться и конкурировать за взаимодействие с левыми плечами секвестора трансляции и терминатора транскрипции, соответственно. Поэтому мы решили провести опыт по гидролизу РНК на укороченной матрице лидерной мРНК, длиной 240 нуклеотидов (рис. 28Б), которая не содержит последовательности секвестра трансляции.

Как следует из данных, представленных на рис. 28Б, в районе 206-210 нуклеотидов наблюдается более интенсивный гидролиз РНК в присутствии ФМН, чем в его отсутствие. Из этого следует, что формирование в присутствии ФМН потенциальной терминирующей шпильки VIII (рис. 19)

стабилизирует одноцепочечную конфигурацию РНК в районе нуклеотидов 206-210. Любопытно, что в отсутствии ФМН этот участок, по-видимому, вовлекается в формирование потенциального анти-терминатора с теми же

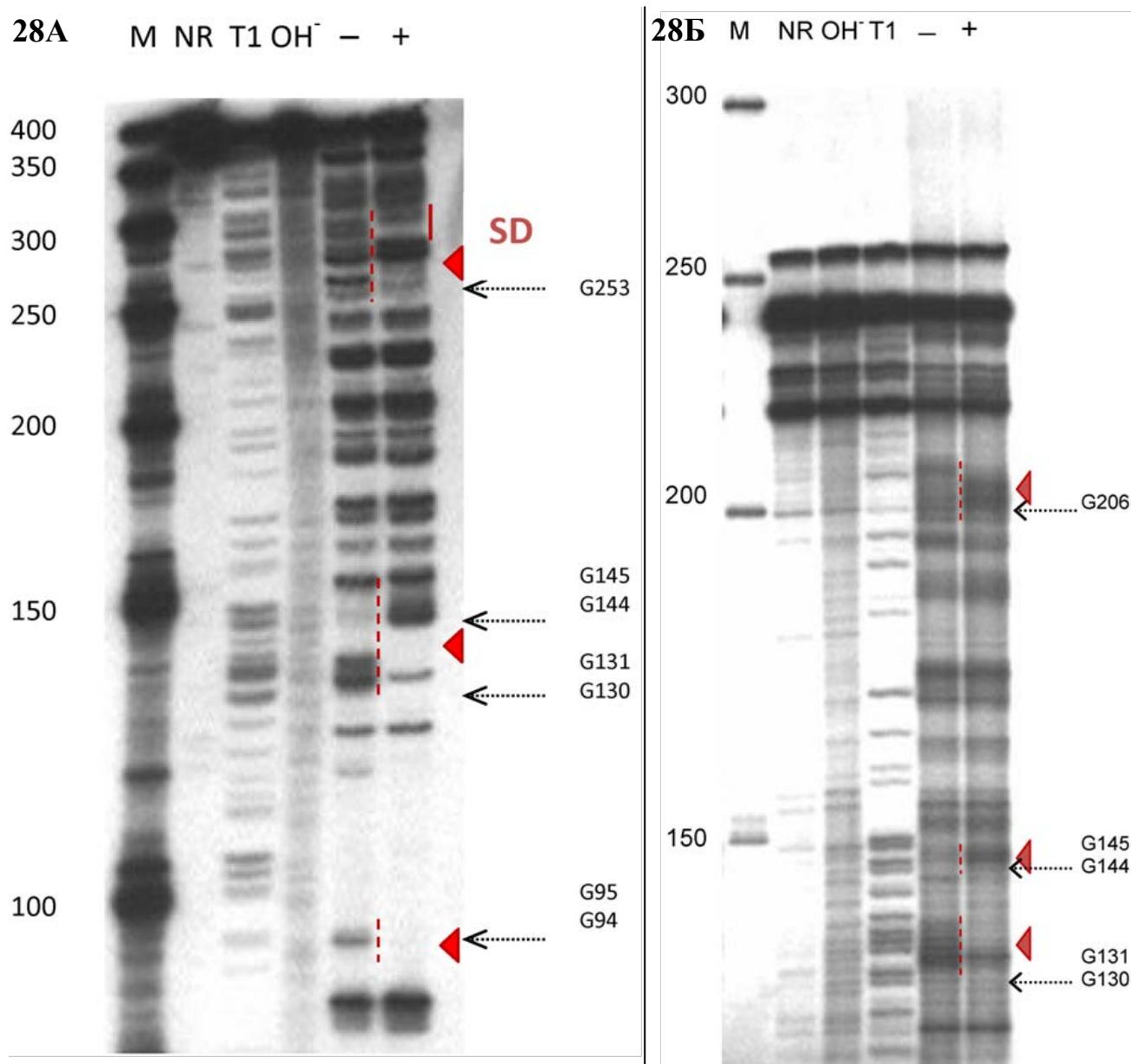


Рисунок 28. Спонтанный гидролиз мРНК гена *uraA*, длиной 380 (А) и 240 (Б) нуклеотидов. Первая дорожка соответствует РНК-маркеру, длина транскриптов которого обозначена слева от рисунка. Вторая дорожка соответствует РНК, которая не подвергалась расщеплению (NR); T1 – продукты специфического расщепления РНК с помощью РНКазы T1, OH⁻ – 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.

нуклеотидами, локализованными в положении 144-147, которые, как было показано выше, участвуют в формировании анти-секвестра трансляции. Об

этом свидетельствует менее эффективный гидролиз РНК в этом участке в отсутствие ФМН.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет предложить модель регуляции экспрессии гена *uraA*, представленную на рис. 29. Согласно этой модели регуляция экспрессии гена *uraA* с помощью ФМН зависимого рибопереключателем осуществляется на двух уровнях – терминирования транскрипции на Rho-независимом терминаторе транскрипции и инициации трансляции в результате секвестрирования сайта связывания рибосомы. В отсутствие ФМН происходит формирование анти-терминатора и анти-секвестора, что позволяет осуществлять эффективную экспрессию гена *uraA*. 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. При сравнении этих альтернативных структур между собой (рис 29), обращает на себя внимание то обстоятельство, что стебель шпильки анти-секвестора характеризуется большей протяженностью и, возможно, в ходе фолдинга лидерной РНК формирование именно этой структуры является более предпочтительным. Для интерпретации полученных данных мы выдвигаем гипотезу «динамической регуляции» экспрессии гена *uraA* с участием ФМН зависимого рибопереключателем. 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*. По-видимому, важным параметром в предлагаемой модели регуляции является скорость, с которой РНК-полимераза удлиняет цепь мРНК. В экспрессионной платформе сразу после *rfn*-элемента располагается шпилька VII, образующаяся, судя по нашим

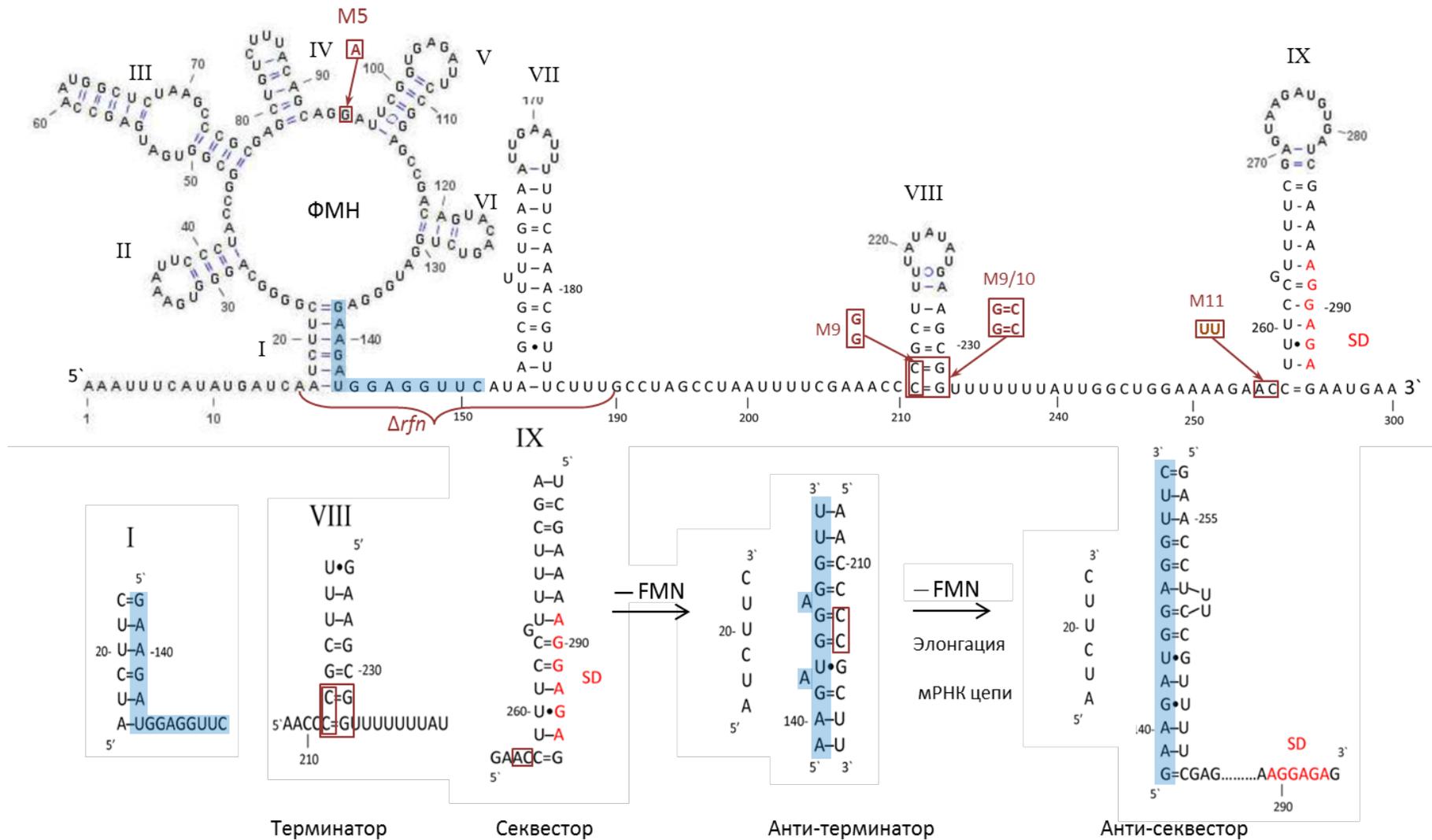


Рисунок 29. Модель регуляции экспрессии гена *uraA* *B. subtilis* с помощью ФМН-зависимого рибопереключател. (А) Вторичная структура лидерной области в присутствии ФМН. (Б) Регуляторные элементы, реализующиеся в зависимости от ФМН. Шпильчатые структуры пронумерованы римскими цифрами. Соответствующие нуклеотидные замены выделены рамкой. Делеционный мутант показан фигурной скобкой. Сайт связывания рибосомы SD выделен красным цветом. Область аптамерной части ФМН-зависимого рибопереключател, участвующего в формировании альтернативных структур выделена голубым маркером.

данным, независимо от ФМН. Поскольку за этой шпилькой расположено несколько урациловых остатков, она, вероятно, может быть вовлечена в аттенуацию транскрипции. Кроме того, такая структура должна служить препятствием для РНК-полимеразы и снижать скорость транскрипции лидерной области, обеспечивая более продолжительный временной интервал для взаимодействия аптамерной части рибопереключателю с ФМН. Так в работе [153] по изучению ФМН-зависимого рибопереключателю, локализованного перед *rib*-опероном *B.subtilis*, было показано, что наличие двух сайтов пауз в лидерной области мРНК, снижающих скорость транскрипции, способствует эффективной терминации. Выявленные нами особенности регуляции гена *uraA* с участием ФМН-зависимого рибопереключателю, является еще одним свидетельством того, что рибопереключателю могут использовать комбинации различных механизмов для регуляции экспрессии генов.

6. Исследование регуляции экспрессии гена *ribB E.coli*

У бактерии *E.coli* *rib*-гены, кодирующие ферменты биосинтеза рибофлавина, не сцеплены на хромосоме и сведений об их регуляции опубликовано совсем немного. Методами сравнительного компьютерного анализа регуляторных областей *rib*-генов был обнаружен консервативный *rfn*-элемент только перед структурным геном *ribB*, который кодирует 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу [141]. В работе [4] 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. 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 *sroG*, соответствующая лидерной области гена *ribB* [112; 142]. Структура этой малой РНК содержит лиганд-связывающий домен и не содержит Rho-независимого терминатора. Изучению регуляции транскрипции гена *ribB E.coli* и будет посвящена данная глава.

6.1. 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 *sroG*, может происходить в результате Rho-зависимой терминации. Для проверки этого предположения, мы изучали эффект специфического ингибитора Rho-фактора антибиотика бицикломицина (BCM) на изменение активности β -галактозидазы для транскрипционных фьюзов лидерной области гена *ribB* с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора.

Соответствующие транскрипционные фьюзы были получены на основе вектора pJEL250, в котором ген *lacZ* лишен собственного промотора, но при этом сохранена SD-последовательность. Перед SD-последовательностью расположен полилинкер, в который по сайтам узнавания рестриктаз *EcoRI* и *VamHI* были клонированы фрагменты лидерной области гена *ribB* дикого типа, а также ее мутантные варианты M1 и M2. Нуклеотидные замены, соответствующие мутации M1 (A11→T, G12→C, G13→C, G14→C, C15→T), стабилизируют конфигурацию рибопереключателю «+ФМН», поскольку такие нуклеотидные замены приводят к увеличению стебля шпильки P1. Пространственная структура лидерной области с нуклеотидными заменами M2 (G140→A, G142→A, G144→A) независимо от присутствия ФМН принимает конфигурацию рибопереключателю «-ФМН», поскольку такие нуклеотидные замены препятствуют образованию шпильки P1 (рис. 30). Фенотипическое проявление таких мутаций было подробно описано в работе [4], в которой изучали ФМН-зависимую регуляцию гена *ribB* *E.coli*.

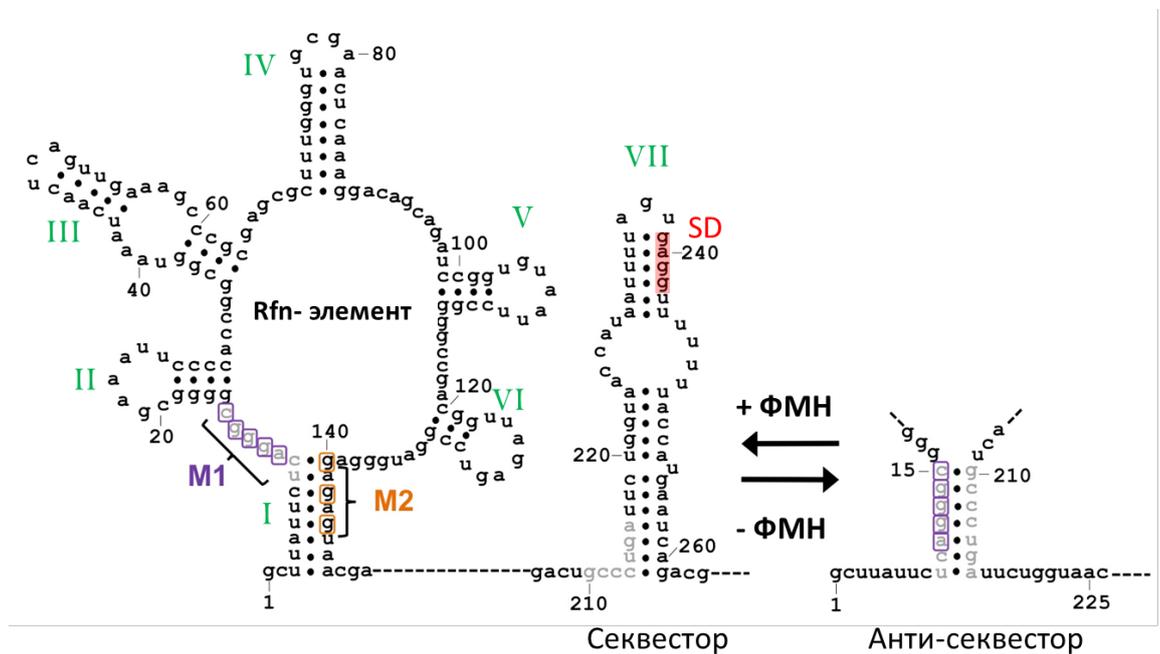


Рисунок 30. Структура ФМН-зависимого рибопереключателю гена *ribB* *E.coli* в зависимости от ФМН. Шпильчные структуры пронумерованы римскими цифрами. Последовательность сайта связывания рибосомы (SD) выделена красным маркером. Нуклеотиды, формирующие стебель шпильки анти-секвестора в отсутствии связывания с ФМН, выделены серым цветом. Соответствующие нуклеотидные замены выделены рамкой и обозначены фигурной скобкой.

Для получения фрагментов лидерной области с мутациями M1 и M2 были синтезированы олигонуклеотидные праймеры E4 и E5, E13 и E14 соответственно, в нуклеотидной последовательности которых были сделаны соответствующие замены. С помощью ПЦР с хромосомы с хромосомы *E.coli* MG1655 были амплифицированы следующие фрагменты E0-E4=264 нп, E0-E14=394 нп (фланкируют 5'-конец гена *ribB*) и E5-B201=340 нп, E13-B201=213 нп (фланкируют 3'-конец гена *ribB*), а также полноразмерный фрагмент лидерной области дикого типа E1-E8. Затем осуществили состыковку фрагментов E0-E4 с E5-E201 и E0-E14 с E13-B201 и провели наработку мутантных лидерных областей гена *ribB* с участием фланкирующих праймеров E1 и E8. Далее по сайтам узнавания рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* ПЦР-фрагменты E1-E8(wt), E1-E8(M1), E1-E8(M2) клонировали в вектор pJEL250 для получения транскрипционных фьюзов *ribB-LacZ*. Полученными плазмидами трансформировали штамм *E.coli* AM4002, у которого наличие транспозона Tn5 в гене *ribB* нарушает биосинтез рибофлавина, а наличие транспозона Tn10 в гене *lacZ* позволяет использовать этот штамм в качестве реципиента для полученных конструкций. Определение активности β -галактозидазы проводили для рекомбинантных штаммов, выращенных на полноценной LB-среде при добавлении либо нет 50 μ M рибофлавина и/или BSM в концентрации 25 мкг/мл. Результаты эксперимента представлены на рисунке 31.

В случае транскрипционного фьюза лидерной области дикого типа с геном *lacZ* в присутствии рибофлавина активность β -галактозидазы снижается почти в 5 раз. Однако добавление BSM снимает репрессирующее действие рибофлавина – предшественника ФМН. Внесение мутаций M1 и M2, стабилизирующих две альтернативные структуры рибопереключателя независимо от присутствия ФМН, позволяет оценить влияние конфигурации рибопереключателя на возможность Rho-зависимой терминации транскрипции гена *ribB*. В случае мутантной лидерной области M1 независимо от присутствия рибофлавина в среде происходит подавление

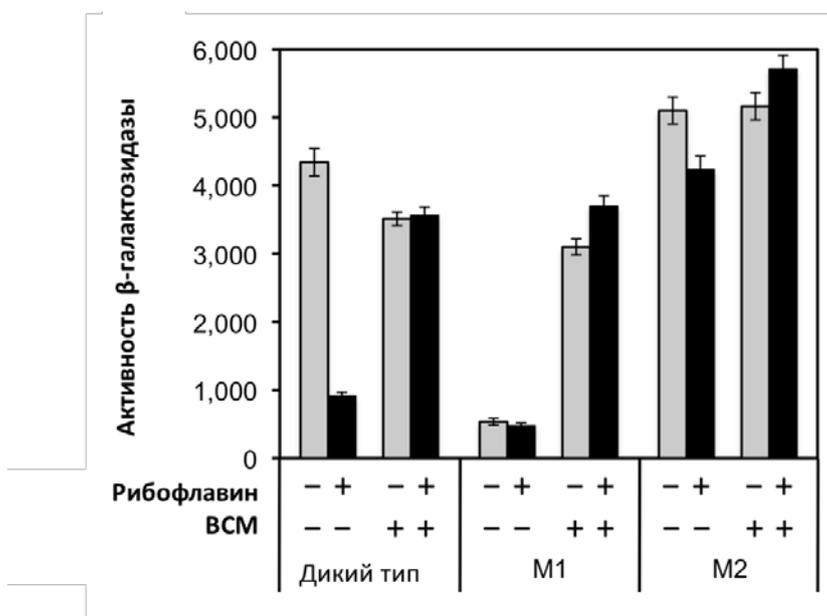


Рисунок 31. Влияние бицикломицина на активность β-галактозидазы для транскрипционных фьюзов *ribB-LacZ*. Культуры клеток *E.coli* AM4002, содержащие транскрипционные фьюзы лидерной области гена *ribB* дикого типа и ее мутантных вариантов M1 и M2 с репортерным геном *lacZ*, выращивали при 30°C в течение ночи на полноценной среде LB с добавлением 50 μM рибофлавина и 50 мкг/мл ампициллина. Затем клетки отмывали и разбавляли в 25 раз свежей средой, содержащей либо нет 50 μM рибофлавина и/или с 25 мкг/мл ВСКМ в зависимости от варианта. Клетки растили при 30°C в течение 2-2,5 часов до средней экспоненциальной фазы роста.

экспрессии репортерного гена. Так, уровень активности β-галактозидазы остается низким в условиях дерепрессии и соответствует значению, характерному для транскрипционного фьюза лидерной области дикого типа с *lacZ* в присутствии рибофлавина. Добавление ВСКМ в случае мутантной лидерной области M1 приводит к значительному увеличению активности β-галактозидазы независимо от присутствия рибофлавина в ростовой среде. Для транскрипционных фьюзов лидерной области с мутацией M2, имитирующей структуру рибопереклювателя «-ФМН», наблюдаются высокие значения активности β-галактозидазы и добавление ВСКМ 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 M1 и M2 с геном *lacZ*.

6.2. Определение доли полноразмерного транскрипта гена *ribB* методом «достройки праймера»

Чтобы оценить долю полноразмерного транскрипта в зависимости от ФМН, мы воспользовались методом «достройки праймера». С этой целью был синтезирован олигонуклеотид E22, комплементарный структурной части гена *ribB*. Для реакции обратной транскрипции использовали 15мкг суммарной РНК, выделенной из штамма *E.coli* AM4002 pMZ25, который растили на полноценной LB-среде с добавлением либо нет 50μМ рибофлавина и/или 25 мкг/мл ВСМ. Результаты эксперимента представлены на рисунке 32.

В условиях дерепрессии, т.е. в отсутствии рибофлавина в ростовой среде, происходит образование полноразмерной мРНК гена *ribB*, что обнаруживается по накоплению продукта кДНК, размером 285 нуклеотидов. При добавлении рибофлавина в среду Rho-фактор терминирует транскрипцию гена *ribB* в лидерной области, поскольку соответствующий фрагмент кДНК, образующийся в результате реакции обратной транскрипции с участием праймера, комплементарного структурной части гена, на электрофореграмме едва различим. Добавление ВСМ, который ингибирует действие Rho-фактора, устраняет негативный эффект, опосредованный присутствием рибофлавина в ростовой среде, и происходит накопление продуктов реакции обратной транскрипции.

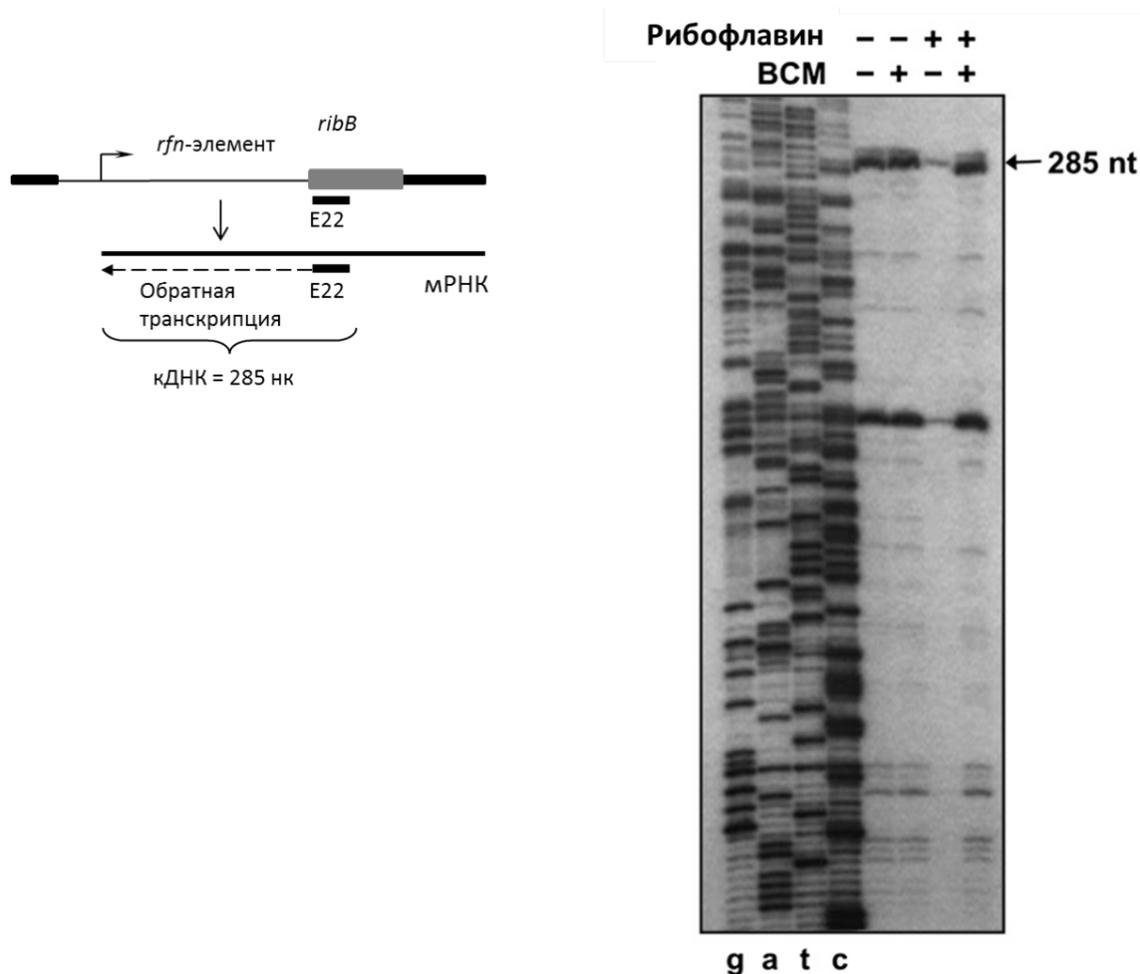


Рисунок 32. Влияние Rho-фактора на транскрипцию структурной части гена *ribB*.

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

Чтобы оценить эффект специфического ингибитора Rho-фактора BSM 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 pMZ25, 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 50μМ рибофлавина и либо с добавлением 25 мкг/мл BSM, либо в его отсутствии. Для реакции обратной транскрипции использовали по 0,05 мкг суммарной РНК в качестве матрицы.

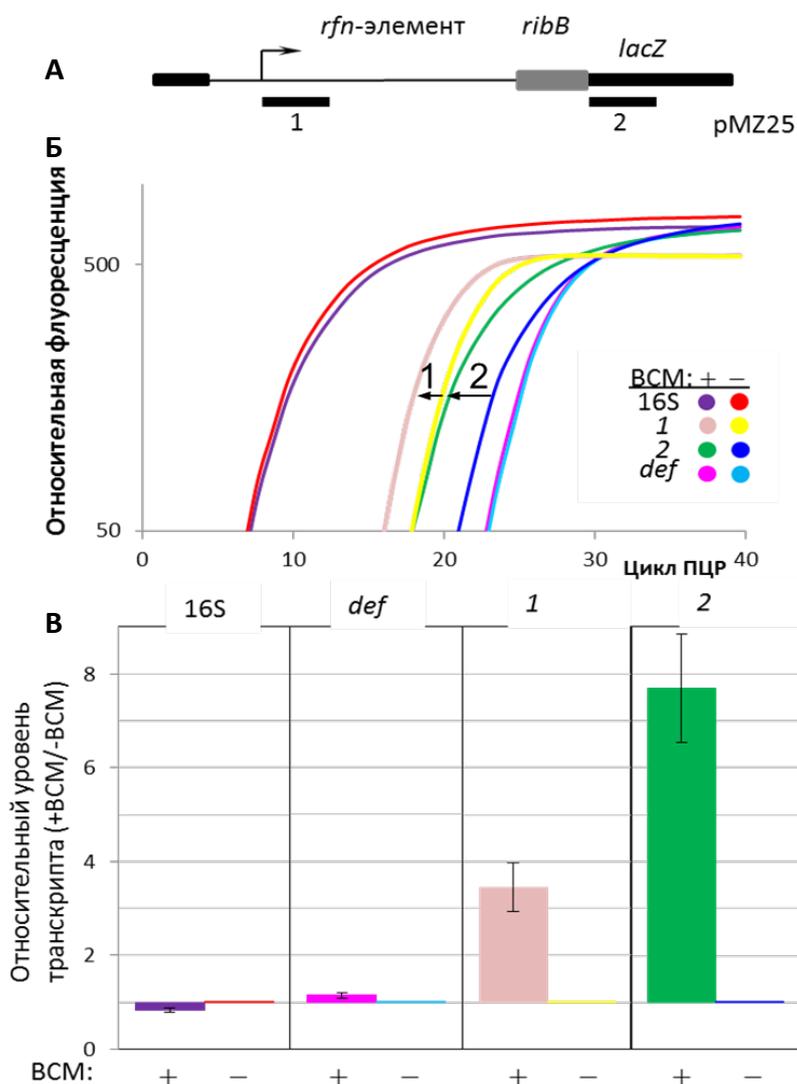


Рисунок 33. Влияние VSM на транскрипцию гена *ribB* *E.coli* в условиях репрессии рибофлавином. (А) Структура плазмиды pMZ25, в полилинкерную область которой был клонирован фрагмент лидерной области гена *ribB* с нативным промотором, за которой расположен структурный ген *lacZ*. Цифрами 1 и 2 обозначены 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.

Для проведения количественной ПЦР было подобрано четыре пары праймеров, две из которых – 16S-F(bs) , 16S-R(bs) (комплементарны участку 16S рРНК) и Def4, Def11 (комплементарны участку гена, кодирующего деформилазу) являются внутренними контролями. Остальные две пары

праймеров E20, B65 и B80, 246-4 позволяют амплифицировать фрагменты, один из которых соответствует дистальной области промотора, а другой – соответствует структурной части гена *lacZ* (см рис 33А).

В результате проведенного эксперимента (рис. 33) 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.

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

Поскольку в опытах *in vivo* транскрипция гена всегда сопряжена с его трансляцией, мы хотели выяснить, вносит ли свой вклад транслирующая рибосома в наблюдаемый эффект. Более того, с помощью реакции транскрипции в очищенной системе *in vitro* можно установить действие ФМН на способность Rho-фактора преждевременно терминировать транскрипцию гена *ribB* напрямую. Для этой цели был синтезирован с помощью ПЦР и пары праймеров ECD и ECR фрагмент гена *ribB*, включающий лидерную область с нативным промотором и небольшую последовательность структурной части. Также были наработаны фрагменты с мутантными лидерными областями M1 и M2. Транскрипция *in vitro* осуществлялась с помощью биотинилированной РНК-полимеразы, использование которой в ходе реакции позволило получить остановленный элонгационный комплекс (ЭК), длиной 24 нуклеотида. Препарат, содержащий [³²P]-меченый стартовый ЭК24, разделяли на 4 равных части и к одному из образцов добавляли 0,1мМ ФМН и/или 0,4 мкМ Rho-фактор. Затем транскрипцию возобновляли внесением в реакционную смесь 10 мкМ нуклеозидтрифостфатов и 1мМ АТФ. Реакцию инкубировали в течение 10

минут при 37°C и останавливали добавлением стоп-раствора. Продукты реакции разгоняли в 6% денатурирующем ПААГ. Результаты эксперимента представлены на рисунке 34.

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 нуклеотида. 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. 34) и происходит с большей эффективностью, по сравнению с тем, когда ФМН в реакционную смесь не добавляли. В случае мутации M1, которая имитирует структуру рибопереклювателя «+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 M2, стабилизирующей альтернативную конфигурацию рибопереклювателя, Rho-зависимая терминация существенно ослабляется (количество полноразмерного транскрипта составляет 70%) и происходит в положении, характерном для реакции транскрипции лидерной области дикого типа без ФМН.

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

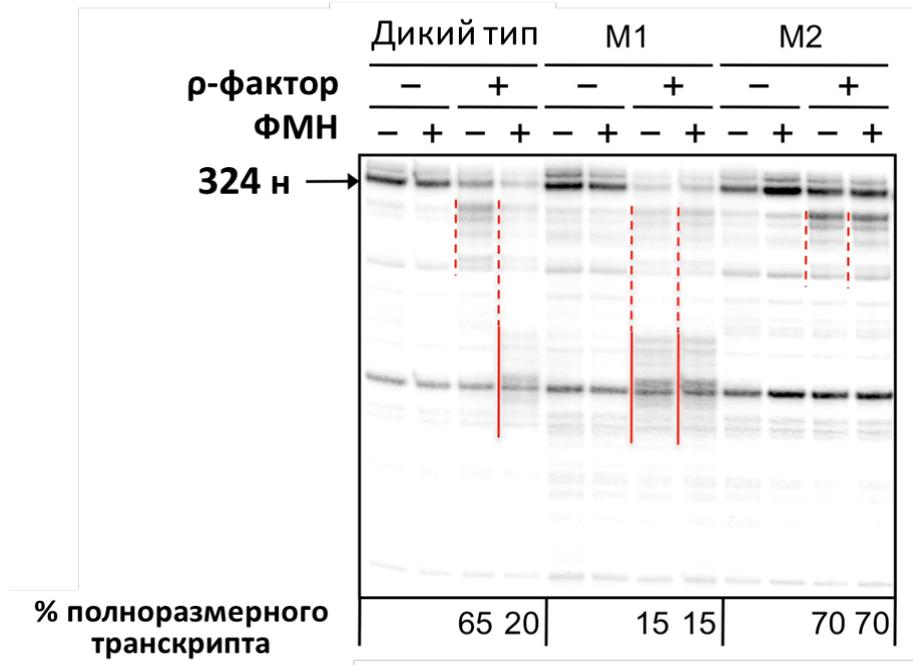


Рисунок 34. Транскрипция лидерных областей гена *ribB* дикого типа, а также ее мутантных вариантов в очищенной системе *in vitro* в присутствии ФМН и/или Rho-фактора. Сплошной красной линией показана область Rho-зависимой терминции, наблюдаемой для лидерной области дикого типа в присутствии ФМН. Прерывистой красной линией показана область Rho-зависимой терминции, наблюдаемой для лидерной области дикого типа без ФМН.

По мере накопления знаний о функционировании рибопереключателей, было высказано предположение, что регуляция экспрессии генов у грамположительных бактерий с помощью рибопереключателей осуществляется на уровне транскрипции, тогда как у грамотрицательных микроорганизмов – на уровне трансляции. Действительно, у бактерий *B.subtilis* ФМН-связывающий рибопереключателем регулирует экспрессию генов рибофлавинового оперона посредством Rho-независимой терминции транскрипции, тогда как у *E.coli* экспрессия гена *ribB*, кодирующего один из ферментов биосинтеза рибофлавина, осуществляется ФМН-связывающим рибопереключателем на уровне инициации трансляции. Первоначально, Rho-фактору была отведена второстепенная роль при регуляции экспрессии гена *ribB* *E.coli*. Так, была выдвинута гипотеза, что Rho-фактор преждевременно прерывает транскрипцию в присутствии ФМН, поскольку ген *ribB* не транслируется в этом случае. Однако наши результаты

свидетельствуют об ином характере регуляции. Помимо контроля трансляции гена *ribB*, ФМН-зависимый рибопереключателъ регулирует и транскрипцию гена *ribB*. На это указывают данные эксперимента *in vitro*, в котором добавление ФМН приводило к Rho-зависимой терминации в тот момент, когда еще не синтезирована SD-последовательность. Более того, нашим коллегам из университета NYU School of Medicine в Нью-Йорке, удалось картировать сайты, на которых Rho-фактор начинает действовать (рис. 35). Эти данные окончательно убеждают нас в том, что Rho-зависимая терминация в результате действия ФМН происходит независимо от процесса трансляции, поскольку сайт терминации располагается выше стартового кодона.

Таким образом, мы обнаружили новый механизм действия рибопереключателъ, который может оказаться весьма распространенным. Так стало известно, что Mg-зависимый рибопереключателъ у *Salmonella enterica* регулирует экспрессию гена *mgtA* также посредством Rho-зависимой терминации.

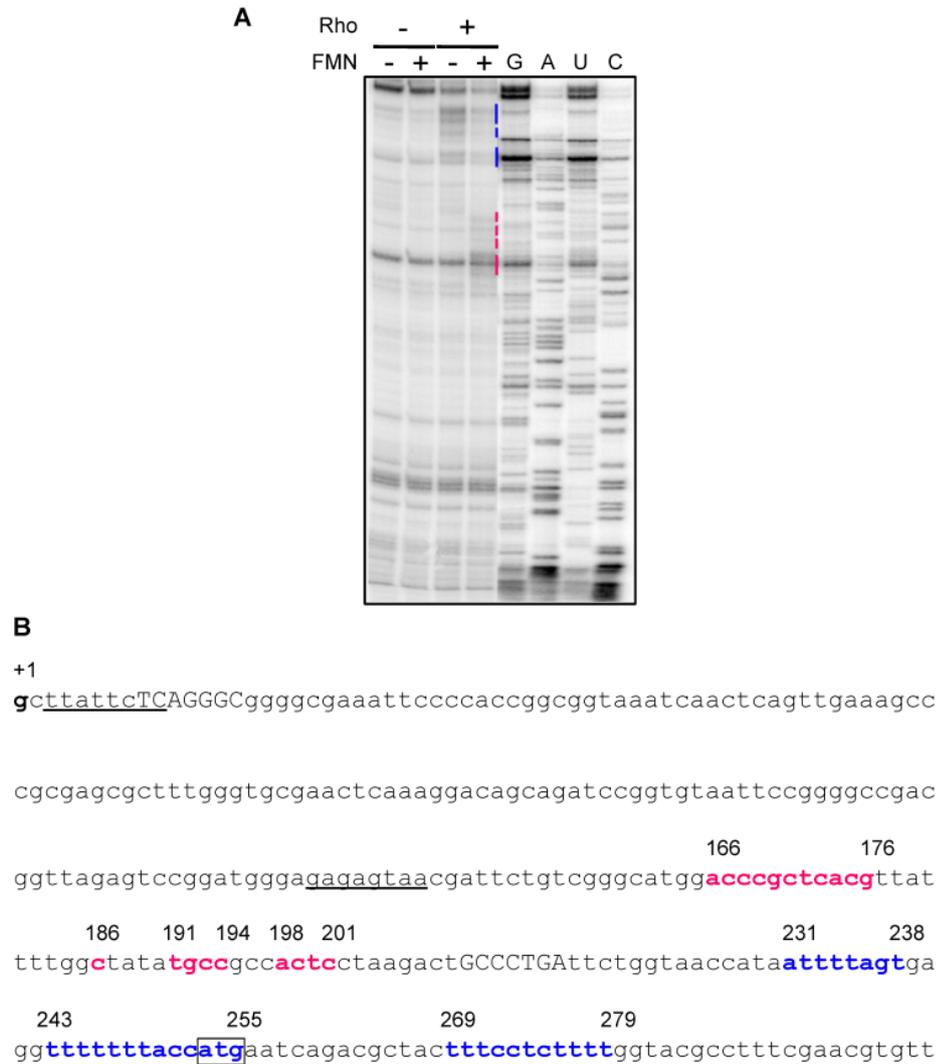


Рисунок 35. Картирование сайтов Rho-зависимой терминации в лидерной области гена *ribB*. (А) Транскрипция *in vitro* фрагмента лидерной области гена *ribB* в зависимости от добавления ФМН и/или Rho-фактора. Красным цветом обозначена Rho-зависимая терминация в присутствии ФМН, синим цветом – в отсутствии ФМН. (Б) Фрагмент нуклеотидной последовательности гена *ribB*. Нумерация нуклеотидов указана в соответствии со стартом транскрипции. Стартовый кодон в процессе трансляции обозначен рамкой.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе диссертационной работы проведено исследование структурно-функциональной организации представителей класса ФМН-связывающих рибопереключателей на моделях рибофлавинового оперона *ribGBANT* *B.subtilis*, гена *uraA* *B.subtilis*, и гена *ribB* *E.coli*. Аптамерный домен ФМН-связывающих рибопереключателей, способный распознавать и связывать фосфорилированные производные рибофлавина (как правило, ФМН) получил название *rfn*-элемента. *Rfn*-элемент характеризуется высокой консервативностью, что позволило осуществлять поиск ФМН-зависимых рибопереключателей в геномах бактерий методами биоинформатики. Аптамерный домен ФМН-зависимых рибопереключателей сочетается с переменным доменом - экспрессионной платформой, использующей различные механизмы для регуляции экспрессии генов.

В случае *rib*-оперона *B.subtilis* транскрипция с основного промотора регулируется с участием ФМН-связывающего рибопереключатателя, расположенного в 5'-некодирующей области мРНК перед первым структурным геном *ribG*. Связывание ФМН с лидерной мРНК приводит к такой конфигурации экспрессионной платформы, в результате которой формируется структура Rho-независимого терминатора, прерывающего транскрипцию в лидерной области. В отсутствие ФМН реализуется альтернативная конфигурация, и формируется структура анти-терминатора, позволяющая дальнейшую транскрипцию структурных генов в виде полицистронной мРНК [99]. Помимо основного промотора *rib*-оперона P1, были обнаружены два дополнительных внутренних промотора P2, расположенного в дистальной области гена *ribB*, и P3, локализованного в интергеноте между генами *ribH* и *ribT* [109]. Транскрипционная активность этих промоторов подробно не изучалась, а их роль в регуляции генов биосинтеза рибофлавина оставалась неясной. Ранее предполагалось, что транскрипционная активность промотора P2 негативно регулируется ФМН

[109]. В ходе нашей работы, мы установили старты транскрипции внутренних промоторов P2 и P3 и с помощью метода RT-qPCR показали, что их транскрипционная активность не зависит от ФМН. Кроме того, мы оценили вклад внутренних промоторов в общую транскрипцию генов *rib*-оперона методом транскрипционных фьюзов соответствующих промоторных областей P1, P2 и P3 с репортерным геном *lacZ*, лишенного собственного промотора. В результате экспериментов по определению активности β -галактозидазы у полученных фьюзов *ribP₁₋₃-lacZ*, мы установили, что в отсутствии ФМН транскрипционная активность P3 сравнима с основным промотором P1, тогда как активность P2 почти на два порядка ниже. В то же время, при достаточном количестве ФМН внутри клетки, транскрипционная активность промотора P3 примерно в 5 раз выше, чем у основного промотора P1, тогда как активность промотора P2 на порядок ниже. Таким образом, судя по нашим данным, промотор P2 не оказывает существенного влияния на транскрипцию генов *rib*-оперона ввиду его слабой транскрипционной активности. Вопрос о значении промотора P3 остается открытым, поскольку под его контролем транскрибируется единственный ген *ribT*, продукт которого не участвует в биосинтезе рибофлавина и его функция в клетке остается неизвестной. В итоге проведенной работы, мы можем заключить, что основной вклад в регуляцию генов биосинтеза рибофлавина у *B.subtilis* вносит промотор P1, подверженный негативной ФМН-зависимой регуляции с участием рибопереключателея на уровне терминации транскрипции.

На модели гена *uraA* *B.subtilis*, кодирующего транспортер рибофлавина, мы показали, что ФМН-зависимый рибопереключателея может осуществлять двойной контроль, а именно действовать на уровне терминации транскрипции и инициации трансляции. В результате экспериментов по транскрипции *in vitro* мы установили, что добавление ФМН к реакционной смеси вызывает преждевременную терминацию в лидерной области гена *uraA* в районе 210-240 нуклеотидов. Мутация M9

(C212→G; C213→G), нарушающая целостность шпильки предполагаемого Rho-независимого терминатора, снимает негативный эффект ФМН в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. С другой стороны, методом тоупринт анализа мы показали, что в присутствии ФМН SD-последовательность оказывается недоступной для связывания рибосомы в результате формирования шпильки секвестра трансляции. Чтобы прояснить модель регуляции гена *uraA*, мы идентифицировали альтернативные структуры в лидерной мРНК, которые формируются в отсутствие ФМН, на основании данных по гидролизу мРНК (*in-line probing*). Оказалось, что в формировании анти-терминатора и анти-секвестра участвует одна и та же область *rfn*-элемента.

Для объяснения полученных данных, мы выдвинули гипотезу «динамической регуляции» экспрессии гена *uraA* с участием ФМН-зависимого рибопереключателея. В отсутствие ФМН в процессе транскрипции, 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*. По-видимому, характер фолдинга лидерной мРНК определяется кинетическими параметрами, в частности, скоростью, с которой РНК-полимераза удлиняет цепь мРНК. В экспрессионной платформе сразу после *rfn*-элемента располагается шпилька VII, образуемая, судя по нашим данным, независимо от ФМН. Поскольку за этой шпилькой расположено несколько урациловых остатков, она, вероятно, может быть вовлечена в аттенюацию транскрипции. Кроме того, такая структура должна служить препятствием для РНК-полимеразы и снижать скорость транскрипции лидерной области, обеспечивая более продолжительный временной интервал для взаимодействия аптамерной части рибопереключателея с ФМН. Так, в работе [153] по изучению ФМН-

зависимого рибопереключателя, локализованного перед *rib*-опероном *B. subtilis*, было показано, что наличие двух сайтов пауз в лидерной области мРНК, снижающих скорость транскрипции, способствует эффективной терминации. Более того, зависимость функции рибопереключателя от кинетических параметров, таких как время, за которое осуществляется процесс транскрипции и константа скорости ассоциации и диссоциации лиганда с аптамером, была доказана на примере аденинового рибопереключателя, локализованного в 5'-нетранслируемой области гена *pbuE B. subtilis* [52; 152].

На модели гена *ribB E. coli* мы получили еще одно подтверждение, что реализация действия рибопереключателей на экспрессию генов может определяться взаимодействием разных регуляторных факторов. Ранее было показано, что ФМН-зависимый рибопереключатель функционирует на уровне инициации трансляции этого гена [4]. Однако в ходе нашего исследования, мы установили, что в присутствии ФМН лидерная мРНК гена *ribB* формирует конфигурацию, которая обеспечивает связывание Rho-фактора, вследствие чего происходит преждевременная терминация транскрипции лидерной мРНК. Обнаруженный механизм – первый пример прямого влияния структуры сенсорной РНК на взаимодействие с белковыми факторами. Ранее Rho-фактору приписывали второстепенную роль в регуляции экспрессии генов с участием рибопереключателей, которая заключалась в том, что в отсутствие трансляции в результате секвестирования SD-последовательности, Rho-фактор, связываясь с непокрытой рибосомами мРНК, приводит к преждевременной терминации транскрипции полноразмерной мРНК. В ходе нашей работы мы показали, что вероятность Rho-зависимой терминации определяется конфигурацией лидерной мРНК. На модели гена *ribB E. coli* было продемонстрировано, что в присутствии ФМН Rho-фактор способен терминировать транскрипцию гена в лидерной области еще до того, как синтезирована SD-последовательность. Значение определенной конфигурации лидерной мРНК для Rho-зависимой

терминации была подтверждена в опытах с мутантными вариантами мРНК, в которых нуклеотидные замены стабилизируют альтернативные конфигурации мРНК независимо от присутствия ФМН.

Следует отметить, что Rho-зависимая терминация транскрипции может оказаться довольно распространенным механизмом действия рибопереключателей, о чем свидетельствует обнаружение ряда малых РНК, размер которых точно соответствует предсказанным рибопереключателем, в структуре которых не содержится классических Rho-независимых терминаторов [64; 115]. Нашими американскими коллегами в опубликованной нами совместной работе показано, что *Mg*-зависимый рибопереключателем у *Salmonella enterica* регулирует экспрессию гена *mgtA* также посредством Rho-зависимой терминации [60]. В зависимости от внутриклеточной концентрации ионов Mg^{2+} 5'-некодирующая лидерная область мРНК гена *mgtA* способна формировать две альтернативные конфигурации, которые модулируют процесс элонгации транскрипции этого гена. Методом транскрипционных фьюзов лидерной области гена *mgtA* с репортерным геном *lacZ* без собственного промотора было установлено, что добавление ВСМ, ингибирующего действие Rho-фактора, приводит к почти 10-ти кратному увеличению активности β -галактозидазы при высокой концентрации ионов Mg^{2+} . В опытах по транскрипции *in vitro*, добавление Rho-фактора к реакционной смеси в случае высокой концентрации ионов Mg^{2+} вызывало преждевременную терминацию транскрипции в местах сайта паузы РНК-полимеразы. Кроме того, мутация, стабилизирующая конфигурацию лидерной мРНК «высокий Mg^{2+} », способствовала повышению АТФазной активности Rho-фактора *in vitro* и преждевременной терминации транскрипции *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, конфигурация лидерной мРНК гена *mgtA*, формирующаяся в присутствии высокой концентрации ионов Mg^{2+} , позволяет Rho-фактору связываться с ней, и далее, используя энергию гидролиза АТФ, пропускать РНК через центральный канал гексамерного комплекса, что приводит к инактивации элонгационного

комплекса на сайте паузы и, как следствие, к терминации транскрипции кодирующей части гена [60].

Таким образом, на примере ФМН-зависимых рибопереключателей, локализованных в некодирующих областях гена *uraA B.subtilis* и гена *ribB E.coli*, мы показали, что рибопереключатели могут одновременно действовать как на уровне терминации транскрипции, так и на уровне инициации трансляции. Ранее, комбинированная регуляция с участием сенсорных РНК была описана только на примере тандемного рибопереключатателя, состоящего из двух разных представителей SAM-II и SAM-V классов и локализованного перед геном *bhmT*, который кодирует бетаин-гомоцистеин метилтрансферазу у океанической бактерии *Candidatus pelagibacter ubique* [114]. Кроме того, опубликованы данные, указывающие на то, что лизиновый рибопереключататель осуществляет контроль экспрессии гена *lysC E.coli* с помощью двух разных механизмов [26]. Согласно этим данным, связывание лидерной мРНК с лизином, с одной стороны, приводит к подавлению инициации трансляции из-за формирования шпильки секвестра, а с другой - обуславливает формирование такой конфигурации лидерной РНК, при которой содержащиеся в ней сайты узнавания для РНКазы E становятся доступными для действия этого фермента, что приводит к деградации лидерной мРНК.

В итоге проведенного исследования, мы показали, что ФМН-зависимые рибопереключататели, распознающие один и тот же метаболит, регулируют экспрессию прилегающих генов различными способами. Так, в случае рибоперона *B.subtilis* контроль экспрессии генов осуществляется на уровне терминации транскрипции в результате формирования шпильки Rho-независимого терминатора. В случае гена *uraA* ФМН-зависимый рибопереключататель осуществляет двойной контроль на уровне терминации транскрипции и инициации трансляции в результате формирования Rho-независимого терминатора и секвестра трансляции, блокирующего сайт связывания рибосомы, соответственно. Регуляция гена *ribB E.coli* также

происходит на двух уровнях, только в отличие от гена *upaA B.subtilis*, терминация транскрипции в присутствии ФМН обусловлена действием Rho-фактора.

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 рибопереключателя на уровне транскрипции и трансляции.
5. На модели гена *ribB E.coli* обнаружен новый механизм регуляции с участием рибопереключателей, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березовский, В. М. Химия витаминов / В. М. Березовский. - Москва: Пищевая промышленность, 1973. - 507-568 с.
2. Гусаров, И. И. Гены биосинтеза рибофлавина *Bacillus amyloliquefaciens*: первичная структура, организация и регуляция активности / И. И. Гусаров [и др.] // Мол. Биол. - 1997. - Т. 31. - №3. - С. 446-453.
3. Гусаров, И. И. Первичная структура и функциональная активность гена *ribC* из *Bacillus subtilis*/ И. И. Гусаров [и др.] // Мол. Биол. - 1997. - Т. 31. - №5. - С. 820-825.
4. Еремина, С. Ю. Мутационный анализ лидерной области гена *ribB* *Escherichia coli*. / С. Ю. Еремина, М. А. Золотухина, Л. Эррайс Лопес, А. С. Миронов // Биотехнология. - 2008. - Т. 2. - С. 14-22.
5. Кренева Р. А. Исследование фенотипического проявления инактивации гена *uraA* *Bacillus subtilis* / Р. А. Кренева [и др.] // Генетика. - 2000. - Т. 36. - №8. - С. 1166-1168.
6. Миронов, А. С. Сенсорные РНК и их роль в регуляции экспрессии генов / А. С. Миронов, К. В. Лобанов; ред. В. А. Ланцов. // Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня (Бреслеровские чтения II). - Гатчина, Санкт-Петербург: ПИЯФ РАН, 2007 - С. 278-298.
7. Овчарова, И. В. Определение функциональной значимости нуклеотидного состава в области старта транскрипции гена *udp* *Escherichia coli* / И. В. Овчарова, С. Ю. Еремина, А. С. Миронов // Генетика. - 2003. - Т. 39. - №3. - С. 326-335.
8. Перумов, Д. А. Регуляция биосинтеза ФМН и ФАД у *Bacillus subtilis*. / Д. А. Перумов, Р. А. Кренева // Бреслеровские чтения. - 2007. - С. 270-276.
9. Прошкин, С. А. Регуляция элонгации транскрипции у бактерий / С. А. Прошкин, А. С. Миронов // Мол. Биол. - 2011. - Т. 45. - №3. - С. 395-415.
10. Ataide, S. F. Mechanisms of resistance to an amino acid antibiotic that targets translation / S. F. Ataide [et al.] // ACS Chem Biol. - 2007. - V. 2. - №12. - P. 819-827.
11. Bacher, A. Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and properties / A. Bacher [et al.] // J Biol Chem. - 1980. - V. 255. - №2. - P. 632-637.
12. Baker, J. L. Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride / J. L. Baker [et al.] // Science. - 2012. - V. 335. - №6065. - P. 233-235.
13. Barrick, J. E. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches / J. E. Barrick, R. R. Breaker // Genome Biol. - 2007. - V. 8. - №11. - P. R239.
14. Batey, R. T. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine / R. T. Batey, S. D. Gilbert, R. K. Montagne // Nature. - 2004. - V. 432. - №7015. - P. 411-415.
15. Bauer, S. Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin-binding fold / S. Bauer [et al.] // J Mol Biol. - 2003. - V. 326. - №5. - P. 1463-1473.

16. Bereswill, S. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR / S. Bereswill, S. Hinkelmann, M. Kist, A. Sander // J Clin Microbiol. - 1999. - V. 37. - №10. - P. 3159-3166.
17. Block, K. F. Evidence for widespread gene control function by the *ydaO* riboswitch candidate / K. F. Block, M. C. Hammond, R. R. Breaker // J Bacteriol. - 2010. - V. 192. - №15. - P. 3983-3989.
18. Blount, K. Development and application of a high-throughput assay for *glmS* riboswitch activators / K. Blount, I. Puskarz, R. Penchovsky, R. Breaker // RNA Biol. - 2006. - V. 3. - №2. - P. 77-81.
19. Blount, K. F. Riboswitches as antibacterial drug targets / K. F. Blount, R. R. Breaker // Nat Biotechnol. - 2006. - V. 24. - №12. - P. 1558-1564.
20. Bocobza, S. Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom / S. Bocobza [et al.] // Genes Dev. - 2007. - V. 21. - №22. - P. 2874-2879.
21. Breaker, R. R. Riboswitches: from ancient gene-control systems to modern drug targets / R. R. Breaker // Future Microbiol. - 2009. - T. 4. - №7. - C. 771-773.
22. Breaker, R. R. Riboswitches and the RNA world / R. R. Breaker // Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2010. - V. 4. - №2.
23. Breaker, R. R. Prospects for riboswitch discovery and analysis / R. R. Breaker // Mol Cell. - 2011. - V. 43. - №6. - P. 867-879.
24. Bresler, T. P. Study of riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis*. Flavinmononucleotide and flavinadeninedinucleotide as effectors of the riboflavin operon / T. P. Bresler [et al.] // Genetika. - 1973. - V. 9. - P. 84-92.
25. Burgess, C. M. The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism / C. M. Burgess [et al.] // J Bacteriol. - 2006. - V. 188. - №8. - P. 2752-2760.
26. Butler, E. B. Structural basis of cooperative ligand binding by the glycine riboswitch / E. B. Butler, Y. Xiong, J. Wang, S. A. Strobel // Chem Biol. - 2011. - V. 18. - №3. - P. 293-298.
27. Cardinale, C. J. Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli* / C. J. Cardinale [et al.] // Science. - 2008. - V. 320. - №5878. - P. 935-938.
28. Caron, M. P. Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay / M. P. Caron [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2012. - V. 109. - №50. - P. 3444-3453.
29. Cheah, M. T. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches / M. T. Cheah, A. Wachter, N. Sudarsan, R. R. Breaker // Nature. - 2007. - V. 447. - №7143. - P. 497-500.
30. Chen, S. C. Crystal structure of a bifunctional deaminase and reductase from *Bacillus subtilis* involved in riboflavin biosynthesis / S. C. Chen [et al.] // J Biol Chem. - 2006. - V. 281. - №11. - P. 7605-7613.

31. Collins, J. A. Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme / J. A. Collins, I. Irnov, S. Baker, W. C. Winkler // *Genes Dev.* - 2007. - V. 21. - №24. - P. 3356-3368.
32. Coppee, J. Y. Sulfur-limitation-regulated proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study / J. Y. Coppee [et al.] // *Microbiology.* - 2001. - V. 147. - №Pt 6. - P. 1631-1640.
33. Corbino, K. A. Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in *alpha-proteobacteria* / K. A. Corbino [et al.] // *Genome Biol.* - 2005. - V. 6. - №8. - P. R70.
34. Croft, M. T. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches / M. T. Croft, M. Moulin, M. E. Webb, A. G. Smith // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. - V. 104. - №52. - P. 20770-20775.
35. Cromie, M. J. An RNA sensor for intracellular Mg(2+) / M. J. Cromie, Y. Shi, T. Latifi, E. A. Groisman // *Cell.* - 2006. - V. 125. - №1. - P. 71-84.
36. Daldrop, P. Novel ligands for a purine riboswitch discovered by RNA-ligand docking / P. Daldrop [et al.] // *Chem Biol.* - 2011. - V. 18. - №3. - P. 324-335.
37. Dann, C. E. Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA / C. E. Dann, 3rd [et al.] // *Cell.* - 2007. - V. 130. - №5. - P. 878-892.
38. Deigan, K. E. Riboswitches: discovery of drugs that target bacterial gene-regulatory RNAs / K. E. Deigan, A. R. Ferre-D'Amare // *Acc Chem Res.* - 2011. - V. 44. - №12. - P. 1329-1338.
39. Duurkens, R. H. Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU / R. H. Duurkens [et al.] // *J Biol Chem.* - 2007. - V. 282. - №14. - P. 10380-10386.
40. Eberhardt, S. Domain structure of riboflavin synthase / S. Eberhardt [et al.] // *Eur J Biochem.* - 2001. - V. 268. - №15. - P. 4315-4323.
41. Edwards, A. L. A structural basis for the recognition of 2'-deoxyguanosine by the purine riboswitch / A. L. Edwards, R. T. Batey // *J Mol Biol.* - 2009. - V. 385. - №3. - P. 938-948.
42. Edwards, T. E. Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs / T. E. Edwards, D. J. Klein, A. R. Ferre-D'Amare // *Curr Opin Struct Biol.* - 2007. - V. 17. - №3. - P. 273-279.
43. Efimov, I. Proposed steady-state kinetic mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase produced by *Escherichia coli* / I. Efimov, V. Kuusk, X. Zhang, W. S. McIntire // *Biochemistry.* - 1998. - V. 37. - №27. - P. 9716-9723.
44. Eitinger, T. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions / T. Eitinger, D. A. Rodionov, M. Grote, E. Schneider // *FEMS Microbiol Rev.* - 2011. - V. 35. - №1. - P. 3-67.
45. Epshtein, V. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination / V. Epshtein, D. Dutta, J. Wade, E. Nudler // *Nature.* - 2010. - V. 463. - №7278. - P. 245-249.

46. Epshtein, V. The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria / V. Epshtein, A. S. Mironov, E. Nudler // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2003. - V. 100. - №9. - P. 5052-5056.
47. Fischer, M. Biosynthesis of flavocoenzymes / M. Fischer, A. Bacher // Nat Prod Rep. - 2005. - V. 22. - №3. - P. 324-350.
48. Fischer, M. Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase / M. Fischer, A. Bacher // Arch Biochem Biophys. - 2008. - V. 474. - №2. - P. 252-265.
49. Fuchs, R. T. The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase / R. T. Fuchs, F. J. Grundy, T. M. Henkin // Nat Struct Mol Biol. - 2006. - V. 13. - №3. - P. 226-233.
50. Fuller, T. E. Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes / T. E. Fuller, M. H. Mulks // J Bacteriol. - 1995. - V. 177. - №24. - P. 7265-7270.
51. Gelfand, M. S. A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes / M. S. Gelfand [et al.] // Trends Genet. - 1999. - V. 15. - №11. - P. 439-442.
52. Gilbert, S. D. Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain / S. D. Gilbert, C. D. Stoddard, S. J. Wise, R. T. Batey // J Mol Biol. - 2006. - V. 359. - №3. - P. 754-768.
53. Grill, S. Identification and characterization of two *Streptomyces davawensis* riboflavin biosynthesis gene clusters / S. Grill [et al.] // Arch Microbiol. - 2007. - V. 188. - №4. - P. 377-387.
54. Grundy, F. J. The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes / F. J. Grundy, S. C. Lehman, T. M. Henkin // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2003. - V. 100. - №21. - P. 12057-12062.
55. Gusarov, I. The mechanism of intrinsic transcription termination / I. Gusarov, E. Nudler // Mol Cell. - 1999. - V. 3. - №4. - P. 495-504.
56. Hart, C. M. Rho-dependent transcription termination. Characterization of the requirement for cytidine in the nascent transcript / C. M. Hart, J. W. Roberts // J Biol Chem. - 1991. - V. 266. - №35. - P. 24140-24148.
57. Hartz, D. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes / D. Hartz, D. S. McPheeters, R. Traut, L. Gold // Methods Enzymol. - 1988. - V. 164. - P. 419-425.
58. Hemberger, S. RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains / S. Hemberger [et al.] // BMC Biotechnol. - 2011. - V. 11. - P. 119.
59. Higashitsuji, Y. RibR, a possible regulator of the *Bacillus subtilis* riboflavin biosynthetic operon, *in vivo* interacts with the 5'-untranslated leader of *rib*-mRNA / Y. Higashitsuji [et al.] // FEMS Microbiol Lett. - 2007. - V. 274. - №1. - P. 48-54.
60. Hollands, K. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination / K. Hollands [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2012. - V. 109. - №14. - P. 5376-5381.

61. Huang, L. Structural insights into ligand recognition by a sensing domain of the cooperative glycine riboswitch / L. Huang, A. Serganov, D. J. Patel // *Mol Cell*. - 2010. - V. 40. - №5. - P. 774-786.
62. Humbelin, M. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production / M. Humbelin [et al.] // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* - 1999. - V. 22. - P. 1-7.
63. Inoue, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // *Gene*. - 1990. - V. 96. - №1. - P. 23-28.
64. Irnov, I. Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis* / I. Irnov, C. M. Sharma, J. Vogel, W. C. Winkler // *Nucleic Acids Res.* - 2010. - V. 38. - №19. - P. 6637-6651.
65. Gerhardt, S. Studies on the Reaction Mechanism of Riboflavin Synthase: X-Ray Crystal Structure of a Complex with 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazine / S. Gerhardt [и др.] // *Structure*. - 2002. - V. 10. - P. 1371-1381.
66. Jin, D. J. Slippage synthesis at the galP2 promoter of *Escherichia coli* and its regulation by UTP concentration and cAMP/cAMP receptor protein / D. J. Jin // *J Biol Chem*. - 1994. - V. 269. - №25. - P. 17221-17227.
67. Jin, D. J. Termination efficiency at Rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and Rho / D. J. Jin, R. R. Burgess, J. P. Richardson, C. A. Gross // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1992. - V. 89. - №4. - P. 1453-1457.
68. Kaiser, J. Biosynthesis of vitamin B2 / J. Kaiser [et al.] // *Eur J Biochem*. - 2002. - V. 269. - №21. - P. 5264-5270.
69. Karthikeyan, S. Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a beta barrel fold and a novel active site arch / S. Karthikeyan [et al.] // *Structure*. - 2003. - V. 11. - №3. - P. 265-273.
70. Kelly, M. J. The NMR structure of the 47-kDa dimeric enzyme 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase and ligand binding studies reveal the location of the active site / M. J. Kelly [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2001. - V. 98. - №23. - P. 13025-13030.
71. Kil, Y. V. Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region / Y. V. Kil [et al.] // *Mol Gen Genet*. - 1992. - V. 233. - №3. - P. 483-486.
72. Kim, J. N. Design and antimicrobial action of purine analogues that bind Guanine riboswitches / J. N. Kim [et al.] // *ACS Chem Biol*. - 2009. - V. 4. - №11. - P. 915-927.
73. Kim, J. N. Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine / J. N. Kim, A. Roth, R. R. Breaker // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2007. - V. 104. - №41. - P. 16092-16097.
74. Koh, Y. S. The reversed SoxS-binding site upstream of the *ribA* promoter in *Escherichia coli* / Y. S. Koh, W. H. Chung, J. H. Lee, J. H. Roe // *Mol Gen Genet*. - 1999. - V. 261. - №2. - P. 374-380.

- 75.** Kubodera, T. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR / T. Kubodera [et al.] // FEBS Lett. - 2003. - V. 555. - №3. - P. 516-520.
- 76.** Kunst, F. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* / F. Kunst [et al.] // Nature. - 1997. - V. 390. - №6657. - P. 249-256.
- 77.** Ladenstein, R. The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids / R. Ladenstein [et al.] // Eur J Biochem. - 1994. - V. 223. - №3. - P. 1007-1017.
- 78.** Larsen, J. E. Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter / J. E. Larsen, K. Gerdes, J. Light, S. Molin // Gene. - 1984. - V. 28. - №1. - P. 45-54.
- 79.** Lee, C. Y. Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum* / C. Y. Lee, D. J. O'Kane, E. A. Meighen // J Bacteriol. - 1994. - V. 176. - №7. - P. 2100-2104.
- 80.** Lee, C. Y. The gene convergent to *luxG* in *Vibrio fischeri* codes for a protein related in sequence to *RibG* and deoxycytidylate deaminase / C. Y. Lee, R. B. Szittner, C. M. Miyamoto, E. A. Meighen // Biochim Biophys Acta. - 1993. - V. 1143. - №3. - P. 337-339.
- 81.** Lee, E. R. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger / E. R. Lee [et al.] // Science. - 2010. - V. 329. - №5993. - P. 845-848.
- 82.** Lee, E. R. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression / E. R. Lee, K. F. Blount, R. R. Breaker // RNA Biol. - 2009. - V. 6. - №2. - P. 187-194.
- 83.** Liao, D. I. Crystal structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of riboflavin biosynthesis / D. I. Liao [et al.] // Structure. - 2001. - V. 9. - №1. - P. 11-18.
- 84.** Liao, D. I. Crystal structure of riboflavin synthase / D. I. Liao [et al.] // Structure. - 2001. - V. 9. - №5. - P. 399-408.
- 85.** Lin, J. W. Riboflavin synthesis genes *ribE*, *ribB*, *ribH*, *ribA* reside in the *lux* operon of *Photobacterium leiognathi* / J. W. Lin, Y. F. Chao, S. F. Weng // Biochem Biophys Res Commun. - 2001. - T. 284. - №3. - C. 587-595.
- 86.** Loh, E. A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes* / E. Loh [et al.] // Cell. - 2009. - V. 139. - №4. - P. 770-779.
- 87.** Mack, M. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC* / M. Mack, A. P. van Loon, H. P. Hohmann // J Bacteriol. - 1998. - V. 180. - №4. - P. 950-955.
- 88.** Magalhaes, M. L. Kinetic and mechanistic analysis of the *Escherichia coli* *ribD*-encoded bifunctional deaminase-reductase involved in riboflavin biosynthesis / M. L. Magalhaes, A. Argyrou, S. M. Cahill, J. S. Blanchard // Biochemistry. - 2008. - V. 47. - №24. - P. 6499-6507.

- 89.** Mandal, M. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria / M. Mandal [et al.] // *Cell*. - 2003. - V. 113. - №5. - P. 577-586.
- 90.** Mandal, M. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator / M. Mandal, R. R. Breaker // *Nat Struct Mol Biol*. - 2004. - V. 11. - №1. - P. 29-35.
- 91.** Mandal, M. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression / M. Mandal [et al.] // *Science*. - 2004. - V. 306. - №5694. - P. 275-279.
- 92.** Mansjo, M. The riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection / M. Mansjo, J. Johansson // *RNA Biol*. - 2011. - V. 8. - №4. - P. 674-680.
- 93.** Mayer, G. High-throughput-compatible assay for glmS riboswitch metabolite dependence / G. Mayer, M. Famulok // *Chembiochem*. - 2006. - V. 7. - №4. - P. 602-604.
- 94.** McDaniel, B. A. Transcription termination control of the S-box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA / B. A. McDaniel, F. J. Grundy, I. Artsimovitch, T. M. Henkin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2003. - V. 100. - №6. - P. 3083-3088.
- 95.** Meining, W. The structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase in complex with riboflavin at 2.6Å resolution / W. Meining, S. Eberhardt, A. Bacher, R. Ladenstein // *J Mol Biol*. - 2003. - V. 331. - №5. - P. 1053-1063.
- 96.** Mellin, J. R. A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes* / J. R. Mellin [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2013. - V. 110. - №32. - P. 13132-13137.
- 97.** Meyer, M. M. Challenges of ligand identification for riboswitch candidates / M. M. Meyer [et al.] // *RNA Biol*. - 2011. - V. 8. - №1. - P. 5-10.
- 98.** Miller, J. H. *A Short Course in Bacterial Genetics* / J. H. Miller. - Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- 99.** Mironov, A. S. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria / A. S. Mironov [et al.] // *Cell*. - 2002. - V. 111. - №5. - P. 747-756.
- 100.** Mironov, V. N. Functional organization of the riboflavin biosynthesis operon from *Bacillus subtilis* SHgw / V. N. Mironov [et al.] // *Mol Gen Genet*. - 1994. - V. 242. - №2. - P. 201-208.
- 101.** Mortl, S. Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli* / S. Mortl [et al.] // *J Biol Chem*. - 1996. - V. 271. - №52. - P. 33201-33207.
- 102.** Mulhbacher, J. Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways / J. Mulhbacher [et al.] // *PLoS Pathog*. - 2010. - V. 6. - №4. - P. e1000865.
- 103.** Muranaka, N. A synthetic riboswitch with chemical band-pass response / N. Muranaka, Y. Yokobayashi // *Chem Commun (Camb)*. - 2010. - V. 46. - №36. - P. 6825-6827.

- 104.** Nahvi, A. Genetic control by a metabolite binding mRNA / A. Nahvi [et al.] // Chem Biol. - 2002. - V. 9. - №9. - P. 1043.
- 105.** Neubauer, O. Two essential arginine residues in the T components of energy-coupling factor transporters / O. Neubauer [et al.] // J Bacteriol. - 2009. - V. 191. - №21. - P. 6482-6488.
- 106.** Nolan, T. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR / T. Nolan, R. E. Hands, S. A. Bustin // Nat Protoc. - 2006. - V. 1. - №3. - P. 1559-1582.
- 107.** Nudler, E. Methods of walking with the RNA polymerase / E. Nudler, I. Gusarov, G. Bar-Nahum // Methods Enzymol. - 2003. - V. 371. - P. 160-169.
- 108.** Ott, E. The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis* / E. Ott, J. Stolz, M. Lehmann, M. Mack // RNA Biol. - 2009. - V. 6. - №3. - P. 276-280.
- 109.** Perkins, J. B. Vitamin biosynthesis / J. B. Perkins, J. Pero; ред. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick. // *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. - Washington, D.C.: American Society Microbiology Press, 2002 - P. 271-286.
- 110.** Perkins, J. B. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin / J. B. Perkins [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 22. - P. 8-18.
- 111.** Peters, J. M. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli* / J. M. Peters [et al.] // Genes Dev. - 2012. - V. 26. - №23. - P. 2621-2633.
- 112.** Peters, J. M. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription / J. M. Peters [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2009. - V. 106. - №36. - P. 15406-15411.
- 113.** Peters, J. M. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles / J. M. Peters, A. D. Vangeloff, R. Landick // J Mol Biol. - 2011. - V. 412. - №5. - P. 793-813.
- 114.** Poiata, E. A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria / E. Poiata, M. M. Meyer, T. D. Ames, R. R. Breaker // RNA. - 2009. - V. 15. - №11. - P. 2046-2056.
- 115.** Raghavan, R. Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli* / R. Raghavan, E. A. Groisman, H. Ochman // Genome Res. - 2011. - V. 21. - №9. - P. 1487-1497.
- 116.** Regulski, E. E. In-line probing analysis of riboswitches / E. E. Regulski, R. R. Breaker // Methods Mol Biol. - 2008. - V. 419. - P. 53-67.
- 117.** Ren, J. GTP cyclohydrolase II structure and mechanism / J. Ren [et al.] // J Biol Chem. - 2005. - V. 280. - №44. - P. 36912-36919.
- 118.** Richardson, J. P. Transcription termination factor rho activity is altered in *Escherichia coli* with *suA* gene mutations / J. P. Richardson, C. Grimley, C. Lowery // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1975. - V. 72. - №5. - P. 1725-1728.
- 119.** Richter, G. Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* / G. Richter [et al.] // J Bacteriol. - 1997. - V. 179. - №6. - P. 2022-2028.

- 120.** Richter, G. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli* / G. Richter [et al.] // J Bacteriol. - 1992. - V. 174. - №12. - P. 4050-4056.
- 121.** Ringquist, S. Toeprinting assays. Mapping by blocks to reverse transcriptase primer extension / S. Ringquist, L. Gold // Methods Mol Biol. - 1998. - V. 77. - P. 283-295.
- 122.** Ritz, H. Biosynthesis of riboflavin: studies on the mechanism of GTP cyclohydrolase II / H. Ritz [et al.] // J Biol Chem. - 2001. - V. 276. - №25. - P. 22273-22277.
- 123.** Rodionov, D. A. A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes / D. A. Rodionov [et al.] // J Bacteriol. - 2009. - V. 191. - №1. - P. 42-51.
- 124.** Rodionov, D. A. Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? / D. A. Rodionov, A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, M. S. Gelfand // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - №23. - P. 6748-6757.
- 125.** Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – USA: N.Y. Cold Spring Harbor Lab, 2001.
- 126.** Serganov, A. Determination of riboswitch structures: light at the end of the tunnel? / A. Serganov // RNA Biol. - 2010. - V. 7. - №1. - P. 98-103.
- 127.** Serganov, A. Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch / A. Serganov, L. Huang, D. J. Patel // Nature. - 2009. - V. 458. - №7235. - P. 233-237.
- 128.** Serganov, A. Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs / A. Serganov [et al.] // Chem Biol. - 2004. - T. 11. - №12. - P. 1729-1741.
- 129.** Skordalakes, E. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading / E. Skordalakes, J. M. Berger // Cell. - 2003. - V. 114. - №1. - P. 135-146.
- 130.** Solovieva, I. M. The riboflavin kinase encoding gene *ribR* of *Bacillus subtilis* is a part of a 10 kb operon, which is negatively regulated by the *yrzC* gene product / I. M. Solovieva, R. A. Kreneva, L. Errais Lopes, D. A. Perumov // FEMS Microbiol Lett. - 2005. - V. 243. - №1. - P. 51-58.
- 131.** Solovieva, I. M. The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon / I. M. Solovieva, R. A. Kreneva, D. J. Leak, D. A. Perumov // Microbiology. - 1999. - V. 145 (Pt 1). - P. 67-73.
- 132.** Stenmark, P. The crystal structure of the bifunctional deaminase/reductase RibD of the riboflavin biosynthetic pathway in *Escherichia coli*: implications for the reductive mechanism / P. Stenmark, M. Moche, D. Gurmu, P. Nordlund // J Mol Biol. - 2007. - V. 373. - №1. - P. 48-64.

- 133.** Stragier, P. Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression / P. Stragier, C. Bonamy, C. Karmazyn-Campelli // Cell. - 1988. - V. 52. - №5. - P. 697-704.
- 134.** Sudarsan, N. Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine / N. Sudarsan [et al.] // Chem Biol. - 2005. - V. 12. - №12. - P. 1325-1335.
- 135.** Sudarsan, N. Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions / N. Sudarsan [et al.] // Science. - 2006. - V. 314. - №5797. - P. 300-304.
- 136.** Sudarsan, N. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP / N. Sudarsan [et al.] // Science. - 2008. - V. 321. - №5887. - P. 411-413.
- 137.** Sudarsan, N. An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine / N. Sudarsan [et al.] // Genes Dev. - 2003. - V. 17. - №21. - P. 2688-2697.
- 138.** ter Beek, J. Quaternary structure and functional unit of energy coupling factor (ECF)-type transporters / J. ter Beek, R. H. Duurkens, G. B. Erkens, D. J. Slotboom // J Biol Chem. - 2011. - V. 286. - №7. - P. 5471-5475.
- 139.** Vagner, V. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* / V. Vagner, E. Dervyn, S. D. Ehrlich // Microbiology. - 1998. - V. 144 (Pt 11). - P. 3097-3104.
- 140.** Valentin-Hansen, P. DNA-protein recognition: demonstration of three genetically separated operator elements that are required for repression of the *Escherichia coli* deoCABD promoters by the DeoR repressor / P. Valentin-Hansen, B. Albrechtsen, J. E. Love Larsen // EMBO J. - 1986. - V. 5. - №8. - P. 2015-2021.
- 141.** Vitreschak, A. G. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation / A. G. Vitreschak, D. A. Rodionov, A. A. Mironov, M. S. Gelfand // Nucleic Acids Res. - 2002. - V. 30. - №14. - P. 3141-3151.
- 142.** Vogel, J. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria / J. Vogel [et al.] // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - №22. - P. 6435-6443.
- 143.** Vogl, C. Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* / C. Vogl [et al.] // J Bacteriol. - 2007. - V. 189. - №20. - P. 7367-7375.
- 144.** Volk, R. Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase / R. Volk, A. Bacher // J Biol Chem. - 1990. - V. 265. - №32. - P. 19479-19485.
- 145.** Volk, R. Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase / R. Volk, A. Bacher // J Biol Chem. - 1991. - V. 266. - №31. - P. 20610-20618.
- 146.** Wachter, A. Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs / A. Wachter [et al.] // Plant Cell. - 2007. - V. 19. - №11. - P. 3437-3450.
- 147.** Wang, W. Crystal structure of a flavin-binding protein from *Thermotoga maritima* / W. Wang [et al.] // Proteins. - 2003. - V. 52. - №4. - P. 633-635.

- 148.** Waters, L. S. Regulatory RNAs in bacteria / L. S. Waters, G. Storz // *Cell*. - 2009. - V. 136. - №4. - P. 615-628.
- 149.** Weinberg, Z. The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches / Z. Weinberg [et al.] // *RNA*. - 2008. - V. 14. - №5. - P. 822-828.
- 150.** Weinberg, Z. Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes / Z. Weinberg [et al.] // *Genome Biol*. - 2010. - V. 11. - №3. - P. R31.
- 151.** Welz, R. Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis* / R. Welz, R. R. Breaker // *RNA*. - 2007. - V. 13. - №4. - P. 573-582.
- 152.** Wickiser, J. K. The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch / J. K. Wickiser, M. T. Cheah, R. R. Breaker, D. M. Crothers // *Biochemistry*. - 2005. - V. 44. - №40. - P. 13404-13414.
- 153.** Wickiser, J. K. The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch / J. K. Wickiser, W. C. Winkler, R. R. Breaker, D. M. Crothers // *Mol Cell*. - 2005. - V. 18. - №1. - P. 49-60.
- 154.** Winkler, W. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression / W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker // *Nature*. - 2002. - V. 419. - №6910. - P. 952-956.
- 155.** Winkler, W. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN / W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2002. - V. 99. - №25. - P. 15908-15913.
- 156.** Winkler, W. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme / W. C. Winkler [et al.] // *Nature*. - 2004. - V. 428. - №6980. - P. 281-286.
- 157.** Winkler, W. An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine / W. C. Winkler [et al.] // *Nat Struct Biol*. - 2003. - V. 10. - №9. - P. 701-707.
- 158.** Yanofsky, C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons / C. Yanofsky // *Nature*. - 1981. - V. 289. - №5800. - P. 751-758.
- 159.** Zhang, P. Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter / P. Zhang, J. Wang, Y. Shi // *Nature*. - 2010. - V. 468. - №7324. - P. 717-720.