

О.Ю. ЛИМАНСЬКА<sup>1,2</sup>, Л.О. МУРТАЗАЄВА<sup>3</sup>, О.П. ЛИМАНСЬКИЙ<sup>1</sup><sup>1</sup> ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», Харків  
E-mail: olga.limanskaya@mail.ru<sup>2</sup> Національний науковий центр «Інститут експериментальної  
і клінічної ветеринарної медицини» НААН України, Харків<sup>3</sup> Медичний центр «Авіценна», Сімферополь

## ПОТЕНЦІЙНІ ТЕМПЕРАТУРНО-ЧУТЛИВІ РИБОПЕРЕМИКАЧІ В ГЕНОМІ САЛЬМОНЕЛ

На цей час відомо низку температурно-чутливих елементів – РНК-термометрів, що відрізняються структурно та функціонально, – які контролюють розмаїття біологічних процесів бактерій, включаючи вірулентність. Відомі РНК-термометри є структурами, що являють собою або одну протяжну шпилькову структуру, або декілька шпильок, які можуть бути як досконалими, так і недосконалими. На основі комп'ютерного та термодинамічного аналізу повністю секвованих геномів 25 ізолятів *Salmonella enterica* встановлено алгоритм та критерії пошуку потенційних РНК-термометрів, що дозволить в подальшому провести пошук потенційних РНК-термометрів в геномі інших соціально значимих патогенів. Для *S. enterica* на додаток до відомого 4U-РНК-термометра визначено чотири шпилькові структури, які можуть бути новими РНК-термометрами. Вони відповідають необхідним та достатнім умовам утворення РНК-термометрів та є висококонсервативними неканонічними структурами, оскільки присутні в геномі всіх досліджених ізолятів *S. enterica*. Проаналізовано температурно-чутливий мотив в плазміді *rXO1* збудника сибірки *Vacillus anthracis*, а досконалі шпильки, що утворюють хрестоподібну структуру в суперспіральній плазміді *rUC8*, візуалізовано за допомогою атомно-силової мікроскопії.

**Ключові слова:** рибоперемикач, РНК-термометр, послідовність Шайн-Дальгарно, шпилькова структура, *Salmonella enterica*, АСМ, атомно-силова мікроскопія.

**Вступ.** Згідно з центральною догмою молекулярної біології молекулам РНК відведена роль пасивного посередника між білками та молекулами ДНК. На цей час встановлено, що молекули РНК можуть не тільки зберігати генетичну інформацію, але й виконувати інші функції. Об'єктом пильної уваги низки науково-дослідних лабораторій є регуляторні РНК прокаріотів, їхня структура, біологічні функції,

ідентифікація, а також можливості використання в галузі медицини та біотехнології.

Встановлено, що регуляторні РНК можуть проявляти каталітичну активність за відсутності кофакторів та розривати фосфодієфірні зв'язки (рибозіми); зв'язувати малі молекули (ліганди) та іони з високою афінністю і специфічністю, здійснюючи моніторинг метаболічного стану клітини та контролюючи експресію генів, ефективність трансляції, термінацію транскрипції та стабільність мРНК; регулювати трансляцію генів, що кодуєть білки теплового та холододового шоку, а також генів вірулентності при зміні температури навколишнього середовища [1–3].

Мікроорганізми, що вільно живуть, періодично піддаються зміні умов навколишнього середовища – температура, рН, наявність живильних речовин постійно змінюються. Для запобігання наслідків температурних коливань у бактерій розвинуто складну сітку захисних механізмів. Як потенційні температурно-чутливі елементи у природі використовуються компоненти від мембрани до молекул ДНК, РНК та білків. Патогенні мікроорганізми часто реагують на температуру близько 37 °С індукцією експресії генів вірулентності. Регуляція генів, що контролюють середовище, може здійснюватися на рівні транскрипції через взаємодію з регуляторними протеїнами. Проте недавно відкрито декілька посттранскрипційних механізмів, що базуються на молекулах РНК [3]. Стало зрозумілим, що певні молекули тРНК є не тільки субстратом для рибосом, але й містять контрольні елементи, які модулюють їхню власну експресію залежним від умов чином. Структурні зміни в таких сенсорних РНК обумовлені специфічними навколишніми змінами.

Розрізняють два принципово різних класи: цис-діючі РНК-елементи, регуляторний потен-

ціал яких знаходиться всередині послідовності мРНК, та транс-діючі, малі, некодуєчі молекули РНК, які функціонують через спарювання нуклеотидів з комплементарними послідовностями мРНК, локалізованими в інших локусах геному [4].

На відміну від класичних атенуаторів, які регулюють структуру лідерної послідовності РНК відповідно до позиції транслуючої рибосоми, цис-діючі РНК змінюють свою конформацію у відповідь на фізичні або хімічні сигнали. Так звані рибоперемикачі здійснюють моніторинг метаболічного стану клітини через зв'язування з високою специфічністю та афінністю з метаболітами. Вони локалізовані в ділянці 5'-UTR (untranslated region, нетранслуюча область) генів, що кодують біосинтез, поглинання або деградацію малих метаболітів та забезпечують контроль зворотного зв'язку для цих шляхів метаболізму.

Зв'язування малої молекули штовхає конформаційний перемикач, що змінює експресію гена одним з трьох можливих механізмів: а) передчасною термінацією транскрипції; б) ініціацією трансляції; в) процесингом мРНК. Більшість рибоперемикачів виключають експресію у зв'язаному стані, проте знайдено незначну кількість перемикачів, що включають експресію генів.

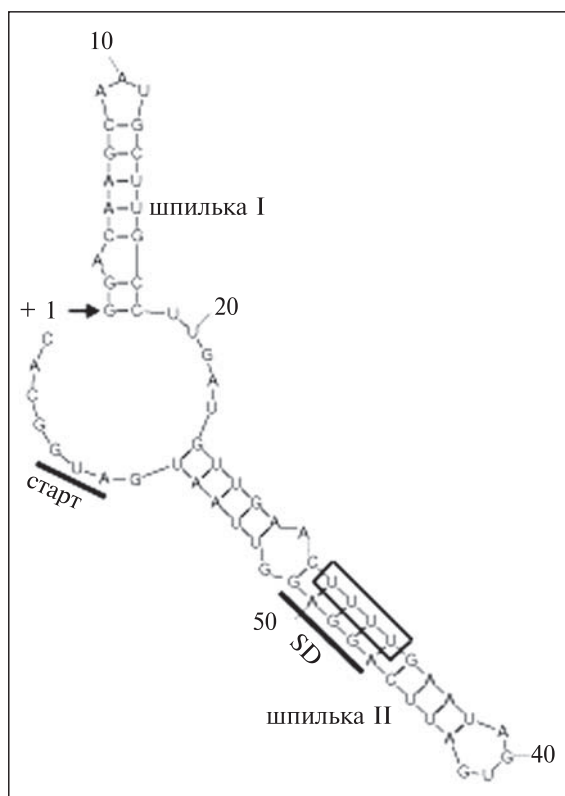
На відміну від високоспецифічних рибоперемикачів, що зв'язуються з метаболітами, близькоспоріднений тип сенсорних мРНК – РНК-термометри – діють у відповідь на загальний фізичний сигнал, а саме на внутрішньоклітинну температуру, яка є важливим параметром, що впливає зокрема на експресію генів, які кодують протеїни теплового та холодового шоку, і генів вірулентності та знаходиться під постійним контролем дуплексів (утворюваних, наприклад, стеблом шпильки РНК-термометра). Добре відомою характеристикою нуклеїнових кислот є те, що вони плавляються при підвищенні температури. Отже, зсув температури здатний модулювати конформацію регуляторних молекул РНК, тобто перехід фрагментів молекули з конформації внутрішньомолекулярної шпильки до одноланцюгового стану.

Наразі відомо низку РНК-термометрів, що структурно та функціонально відрізняються,

які контролюють розмаїття клітинних процесів. Всі відкриті молекулярні термометри, які можуть бути цис- або транс-діючими, здійснюють контроль трансляції через ізоляцію ділянки, що зв'язує рибосому, та більшість з них локалізовані в 5'-UTR бактеріальних генів теплового шоку або генів вірулентності. При низькій температурі послідовність Шайн-Дальгарно (SD-послідовність; 5'-aaggag-3'; 5'-ttaggag-3' – консенсусна послідовність для прокариотів; 5'-uugcu-3' – для грамнегативних бактерій) [4] маскується (знаходиться всередині шпилькової структури). Підвищення температури дестабілізує шпилькову структуру таким чином, що сайт зв'язування рибосоми (SD-послідовність) стає доступним, і це дозволяє ініціацію трансляції (AUG – стартовий кодон ініціації трансляції).

Перший РНК-термометр, що діє через механізм плавлення, знайдено в гені *rpoH* *E. coli*, який кодує альтернативний сигма-фактор  $\sigma^{32}$ , або RpoH [5]. Альтернативний сигма-фактор RpoS відіграє центральну роль в регуляції асоційованих з вірулентністю зовнішніх поверхневих протеїнів OspC та OspA при захворюванні Лайма (Lyme disease), викликаному спірохетою *Borrelia burgdorferi*. Температура є одним з ключових параметрів навколишнього середовища, що контролюється RpoS, а невелика некодуєча молекула РНК, DsrA<sub>Bb</sub>, регулює збільшення кількості RpoS в результаті зміни температури. Lybecker et al. [6] висловили гіпотезу, що DsrA<sub>Bb</sub> знаходиться у стабільній вторинній структурі за  $t = 23$  °C, при якій не відбувається спарювання нуклеотидів з *groS*-транскриптом. Після підвищення температури вторинна структура малої молекули РНК через плавлення руйнується, що веде до зв'язування анти-SD-ділянки *rpoS* мРНК. Це може стимулювати трансляцію через вихід SD-послідовності та сайту ініціації трансляції з вторинної структури в *rpoS* мРНК в умовах вірулентності (37 °C).

Можливо, найрозповсюдженішим бактеріальним РНК-термометром є ROSE-елемент (Repression Of heat-Shock gene Expression), який пригнічує експресію генів теплового шоку. Він був знайдений у багатьох  $\alpha$ - та  $\beta$ -протеобактерій, в тому числі для *E. coli* та *Salmonella enterica* [7]. ROSE-елемент, маючи довжину від 60 до 100 нуклеотидів, локалі-



**Рис. 1.** Вторинна структура, що містить передбачений та підтверджений 4U-РНК-термометр в гені *agsA* *Salmonella enterica* за  $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [8]. Виділено послідовність Шайн-Дальгарно, що знаходиться у стеблі шпильки, та сайт ініціації трансляції

зований, як правило, в 5'-UTR генів теплового шоку. Його доволі складна структура включає 2–4 шпилькові структури, одна з яких містить SD-послідовність та в деяких випадках також стартовий кодон AUG. Іншим широко розповсюдженим РНК-термометром є 4U-елемент, який спочатку було знайдено в гені теплового шоку *agsA* *S. enterica* [8]. Передбачена структура містить дві шпильки, при цьому чотири уридинових залишки утворюють комплементарні пари з SD-послідовністю (рис. 1). Експериментально підтверджено залежне від температури плавлення однієї зі шпильок, а зв'язування рибосоми з SD-послідовністю відбувається тільки за температур теплового шоку.

4U-елемент часто використовують для контролю генів теплового шоку та вірулентності бактерій, оскільки він може зв'язуватися з фрагментом 5'-agga-3' SD-послідовності [8]. Так, пов-

ністю підтверджено гіпотезу контролю за допомогою РНК-термометра для гена *lcrF* (*virF*) *Yersinia sp.*, який кодує регулятор відгуку вірулентності [9]. Трансляція гена не відбувається за температури  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ , але індукується за  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

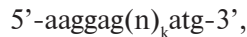
Аналіз регуляторних принципів відомих РНК-термометрів показав, що для їхнього функціонування необхідно, щоб тільки декілька нуклеотидів утворювали комплементарні зв'язки з нуклеотидами SD-послідовності або фланкуючої області для запобігання зв'язування рибосоми. Це означає, що в природі повинні існувати інші, ще невідомі типи РНК-термометрів. І за допомогою біоінформатичного аналізу отримано підтвердження цієї гіпотези [10]. Синтез ефективних штучних РНК-термометрів став іншим доказом цього припущення [11, 12]. Але в багатьох випадках молекулярні деталі механізму чутливості бактерій до зміни температури є ще не повністю зрозумілими.

Результати проведеного нами комп'ютерного аналізу секвенованих послідовностей хромосомної ДНК різних ізолятів *S. enterica* з баз даних свідчать про відсутність 4U-термометра, аналогічного передбаченому для гена *agsA* *S. enterica* та підтверженому в експериментах *in vivo* та *in vitro* Waldminghaus et al. [8] (рис. 1), для трьох з 25 аналізованих ізолятів (номери CP001138, FM200053, NC\_006511). Необхідність пристосовуватися та реплікуватися за різних умов, включаючи температурні коливання, в тому числі між зовнішнім середовищем та організмом хазяїна, веде до необхідності виникнення у патогенів відповідних механізмів, що регулюють експресію генів, до числа елементів яких належать РНК-термометри. Відсутність 4U-РНК-термометрів у деяких ізолятів сальмонел свідчить про можливість існування в них термочутливих елементів, що відрізняються від 4U-термометрів та, можливо, ROSE-елементів. Автори роботи [8] провели пошук нових, раніше невідомих, потенційних РНК-термометрів в послідовностях хромосомної ДНК ізолятів грамнегативної бактерії *Salmonella enterica*.

**Матеріали і методи.** Пошук шпилькових структур. Для комп'ютерного аналізу були вибрані повністю секвеновані послідовності хромосомної ДНК 25 ізолятів *S. enterica*, представ-

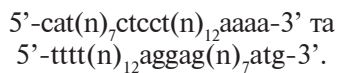
лені на момент проведення досліджень у базі даних GenBank.

Пошук фрагментів хромосомної ДНК бактерій з потенціалом утворення шпилькових структур здійснювали за формулою



де aaggag – SD-послідовність; n – будь-який з можливих нуклеотидів; k = 6–10; atg – сайт ініціації трансляції (використовували також альтернативні сайти ініціації трансляції ttg та gtg).

Крім того, для пошуку гіпотетичних 4U-РНК-термометрів в секвенованих послідовностях «+»- та «-»-ниток хромосомної ДНК *S. enterica* використовували формули



Знайдені послідовності аналізували стосовно відповідності наведеним критеріям.

Для передбачення вторинної структури знайдених лінійних фрагментів ДНК та відповідних їм РНК-транскриптів, а також для визначення температури плавлення потенційних шпильок за фізіологічної іонної сили (I = 0,2 М Na<sup>+</sup>, [Mg]<sup>2+</sup> = 0,0 мМ або I = 0,15 М Na<sup>+</sup>, [Mg]<sup>2+</sup> = 0,2 мМ) застосовували програму Mfold (версія 3.2) [13]. Додатково для побудови шпилькових структур користувались програмою RNA2 пакета програм GeneVee [14].

**Атомно-силова мікроскопія.** Візуалізацію суперспіральної молекули ДНК pUC8 (довжина 2665 п.н.) проведено на атомно-силовому мікроскопі Nanoscope III з D-сканером («Veeco Instruments Inc.», США). АСМ-зображення ДНК записували за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі в режимі «висота» із використанням стандартних незагострених зондів (ЗАО «НТ-МДТ», РФ) з резонансною частотою 300–360 кГц. Процедуру отримання амінослюди здійснювали за допомогою модифікації свіжосколотої слюди аміногрупами у парах перегнаного 3-амінопропілтриетоксисилану, який надано фірмою «Aldrich» (США). Технологію модифікації детально описано раніше [15].

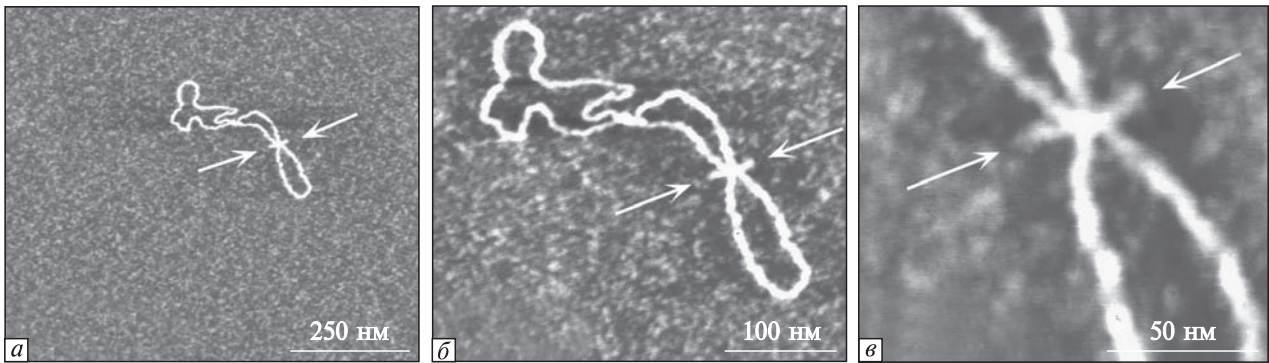
**Результати досліджень та їх обговорення.** До теперішнього часу експериментальне підтвердження функціонування ROSE-термометрів, одного з відомих типів РНК-термометрів, отримано лише для декількох з 40 передбачених

для протеобактерій [16]. Можливість існування 4U-елемента, іншого потенційного РНК-термометра, встановлено для гена *dnaJ* *Brucella melitensis* та для ділянки, що передує гену *groES* *Staphylococcus aureus*. Однак наразі неясно, чи будуть вони функціонувати як РНК-термометри [8].

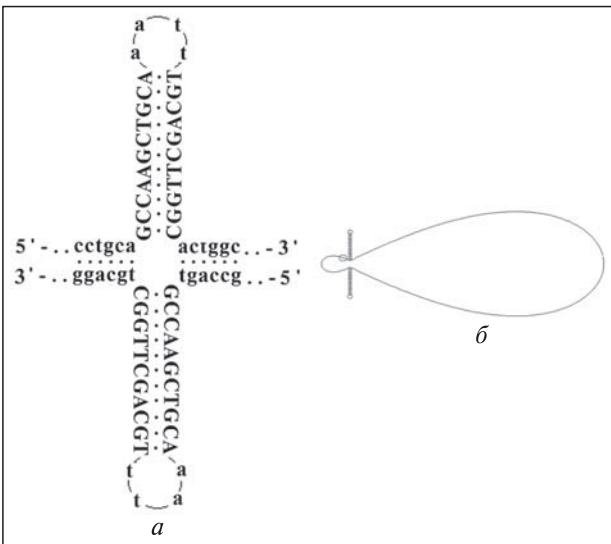
Аналіз особливостей структурної організації експериментально підтверджених РНК-термометрів дозволив нам розробити алгоритм пошуку відповідних фрагментів в послідовностях хромосомних ДНК прокаріотів та, отже, РНК-транскриптів, одним із елементів якого є відстань між SD-послідовністю, що входить до складу шпилькової структури, та сайтом ініціації трансляції, що становить від 6 (для ROSE-елементів) до 12 (для 4U-термометрів) нуклеотидів. Як основні критерії потенційних РНК-термометрів використовували наступні: а) температура плавлення шпильки – в діапазоні 32 °С (за іонної сили 0,1 М Na<sup>+</sup>) – 43 °С (за фізіологічної іонної сили); б) послідовність Шайн-Дальгарно повністю або частково знаходиться у стеблі шпилькової структури; в) кодонами ініціації є канонічний кодон AUG (ATG – для ДНК), з якого у прокаріотів починаються майже 90 % всіх кодуючих послідовностей, а також альтернативні кодони GUG, UUG (GTG, TTG – для ДНК) [17].

Відомі РНК-термометри є структурами, що являють собою або одну протягну шпильку, або декілька шпилькових структур, які можуть бути як досконалими, так і недосконалими. Як показали результати ЯМР-досліджень, стебло шпильки, що має ROSE-елемент, містить декілька неканонічних пар нуклеотидів [18], тому при пошуку гіпотетичних РНК-термометрів нами проаналізовано як досконалі, так і недосконалі шпилькові структури.

Раніше для суперспіральних ДНК, які містять паліндром, встановлено, що за фізіологічних умов можливе утворення шпильки як фрагмента хрестоподібної структури з довжиною стебла не менше 7 п.н. та петлею розміром не вище 4–5 нуклеотидів [19–21]. Довжина стебла шпильок, що утворюються, наприклад, в 16S rRNA, становить в середньому 3–4 п.н., сягаючи 10 п.н. [22], а енергетично найвигіднішою для шпильок молекул РНК є петля з 6–7 нуклеотидів [23]. При цьо-



**Рис. 2.** АСМ-зображення суперспіральної плазміді рUC8 (довжина становить 2665 п.н.) у повітрі. Розмір кадру: *a* – 858 × 858 нм; *б* – 372 × 372 нм; *в* – 134 × 134 нм. Стрілками показано дві шпильки, що утворюють хрестоподібну структуру



**Рис. 3.** Хрестоподібна структура суперспіральної плазміді рUC8, отримана за допомогою пакета прикладних програм GeneVee: *a* – фрагмент послідовності ДНК рUC8 (позиції 273–298), який набуває хрестоподібної структури; *б* – хрест, який утворюють інвертовані повтори ДНК плазміді рUC8

му методом термічної денатурації показано, що шпилькові структури в РНК є стабільнішими порівняно з відповідними структурами, що утворюються в ДНК [24]. Виходячи з літературних даних, отриманих в експериментах як *in vivo*, так *in vitro* [25–28], та враховуючи, що шпилькові структури, які містять SD-послідовність, ефективно впливають на трансляцію тільки в тому випадку, якщо їх вільна енергія становить близько –6 ккал/моль

[29], для подальшого аналізу були вибрані шпильки, довжина петлі яких не перевищувала, як правило, 8 нуклеотидів, довжина стебла – 7 п.н., а вільна енергія  $\Delta G$  становила приблизно від –2 до –6 ккал/моль. Додатково розглядали локалізацію потенційних шпильок відносно генів білків теплового шоку *hsp*.

Переваги об'єднання методики іммобілізації ДНК на амінослюді з можливостями АСМ дозволили нам візуалізувати хрестоподібну структуру, утворену шпильками, суперспіральної ДНК рUC8. Аналіз АСМ-зображення ДНК рUC8 на амінослюді (рис. 2) свідчить, що шпильки виглядають як різко окреслені виступи на нитках ДНК з довжиною, яку можна оцінити безпосередньо із АСМ-зображення. Аналіз наших експериментальних результатів показав, що в утворенні шпильки беруть участь 11–12 п.н., а термодинамічний аналіз інвертованих повторів підтвердив, що шпилька утворена 26 нуклеотидами, а її вільна енергія  $\Delta G$  становить –17,8 ккал/моль. Для порівняння зазначимо, що розмір хрестоподібних структур, які за допомогою методів двовимірного електрофорезу та обробки нуклеазами зареєстровані у ДНК фага  $\phi X$  174, плазмід рBR322, ColE1, рAO3, дорівнює 9–13 п.н. у спіральних ділянках кожної з шпильок хреста, а їхні петлі містять 3–5 нуклеотидів [19, 21].

Відомо, що плазмід рUC8 містить декілька паліндромів, які можуть утворювати хрестоподібні структури у водних розчинах. За допомогою програми Oligo [30] нами з'ясовано, що термодинамічно вигіднішим є хрест, струк-

туру якого наведено на рис. 3. (Концентрацію плазміди pUC8 підбирали таким чином, що для зображення розміром  $2 \times 2$  мкм візуалізували, як правило, 4–5 поодиноких суперспіральних ДНК, які утворювали хрестоподібну структуру.) Вільна енергія  $\Delta G$  однієї з шпильок, які утворювали хрест, становила  $-17,8$  ккал/моль. Пошук самокомплементарних фрагментів у послідовності ДНК pUC8 за допомогою програми RNA2 пакета програм GeneBee [14] також підтвердив, що шпильку утворюють 11 пар нуклеотидів, а петля має довжину 4 нуклеотиди. Модель суперспіральної ДНК pUC8 з утвореною хрестоподібною структурою наведено на рис. 3.

Існують декілька варіантів утворення шпильки хреста. Наприклад, вона може бути утворена як комплементарними інвертованими повторами одного ланцюга, так і повторами, що належать комплементарним ниткам ДНК. Подальше удосконалення АСМ-технології дозволить, на нашу думку, визначити детальну структуру хреста, а саме – які ділянки в ланцюгу ДНК є комплементарними із декількох можливих варіантів утворення цієї неканонічної структури.

Зазначимо, що при візуалізації за допомогою АСМ молекули РНК у більшості досліджень виглядають як конденсовані структури. Раніше нами візуалізовано РНК-транскрипти, іммобілізовані на сльоді, які утворюють джгутоподібні конденсовані структури довжиною  $122 \pm 10$  нм із співвідношенням довжини та ширини  $4,5\text{--}5$  [31]. На нашу думку, для візуалізації витягнутих неконденсованих молекул РНК, що містять шпилькові структури, необхідно змінити поверхневі властивості субстрату (сльоди). Зазначені морфологічні особливості молекул РНК, візуалізованих за допомогою АСМ, можна пояснити значним впливом поверхневих властивостей сльоди, на якій РНК-транскрипти іммобілізовані. Поверхневі властивості субстрату, в свою чергу, визначаються гідрофобністю та щільністю катіонів, локалізованих на поверхні сльоди. Справа в тому, що для візуалізації молекул РНК використовують ту ж сльоду, що і для візуалізації молекул ДНК, тобто сльоду з такою гідрофобністю та поверхневою щільністю катіонів, за якої лінійні та суперспіральні дволанцюгові молекули ДНК не утворюють конденсовані

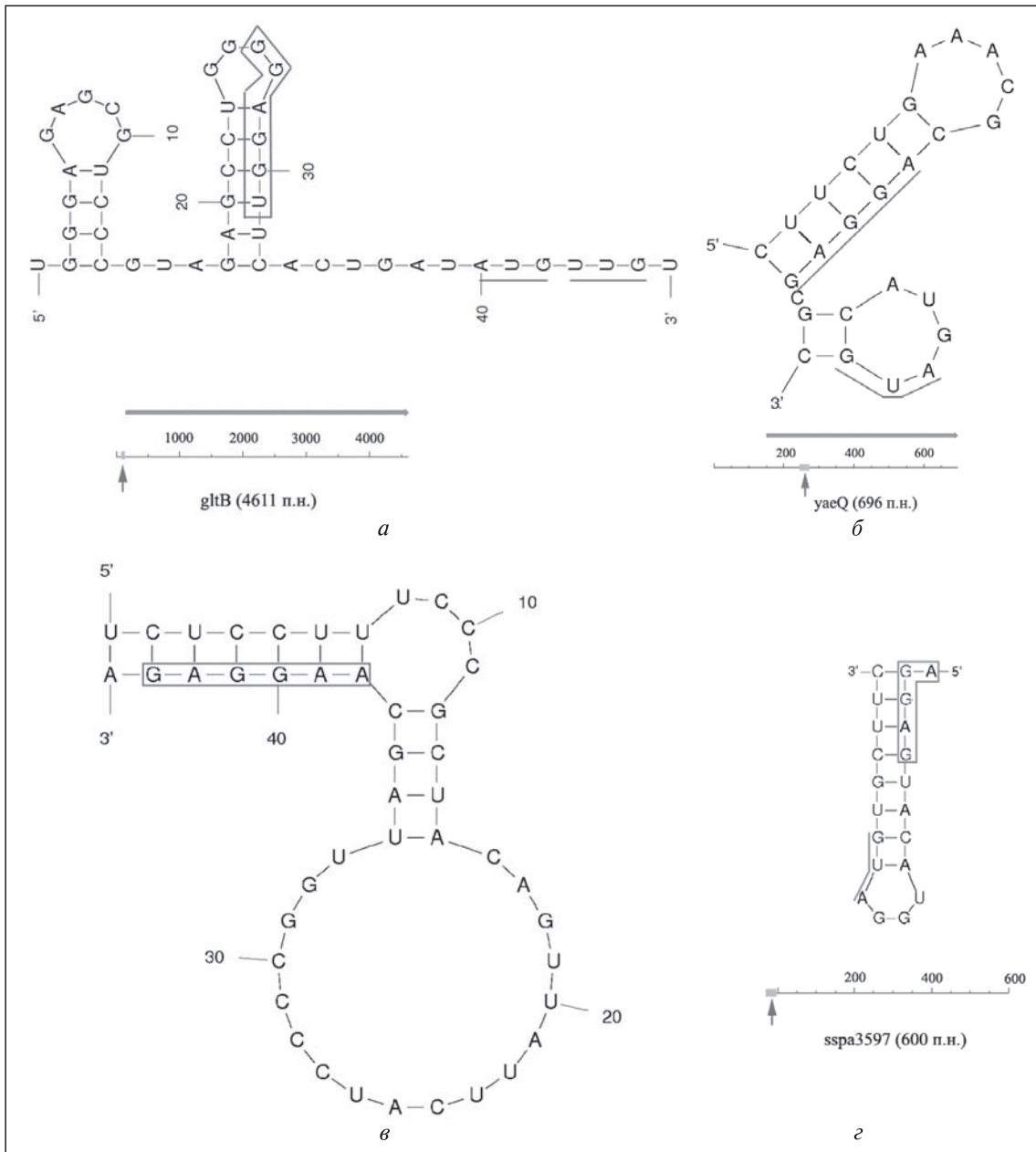
структури при іммобілізації на поверхні сльоди, а характеризуються рівномірним розподілом фрагментів ДНК. Раніше нами встановлено, що навіть незначна зміна гідрофобності та щільності катіонів поверхні сльоди призводить до значної зміни морфології іммобілізованих молекул ДНК [32, 33].

Оскільки термометри можуть локалізуватися в будь-якому локусі молекули РНК, для пошуку шпильок, основних компонентів нових потенційних РНК-термометрів, що відрізняються від відомих 4U-РНК-термометрів, на першому етапі нами проаналізовані послідовності хромосомної ДНК трьох ізолятів *S. enterica*, що не містять 4U-РНК-термометр.

Проведений комп'ютерний та термодинамічний аналіз ізоляту *S. enterica* з повністю секвенованим геномом (номер FM 200053 для GenBank) дозволив виявити чотири шпилькові структури (рис. 4), які задовольняють необхідним умовам потенційного РНК-термометра: послідовність Шайн-Дальгарно; сайт ініціації трансляції, розташований на відстані не більше 15 нуклеотидів; відповідна температура (близько  $40\text{--}42$  °C) плавлення шпильки; локалізація в ділянці 5'-UTR. Наявність відомих 13 генів теплового шоку (з одним із яких зчеплений 4U-РНК-термометр) в ізоляті FM200053 дозволяє припустити, що в геномі сальмонел може існувати декілька типів РНК-термометрів, а не тільки один, на цей час відомий як 4U-РНК-термометр.

Важливо, що шпилькові структури (рис. 4) не тільки відповідають необхідним та достатнім умовам утворення РНК-термометрів, але є висококонсервативними неканонічними структурами. Вони присутні в геномі всіх досліджених 25 ізолятів *S. enterica* і характеризуються 100%-вою подібністю до нуклеотидних послідовностей.

Експресія таких факторів вірулентності, як гемолізін та ліпополісахариди, в протеобактеріях регулюється фактором елонгації транскрипції RfaH. Ген *yaeQ* *S. enterica* був ідентифікований як висококопійний супресор гемолітичного дефекту в делетованому ланцюгу гена *rfaH*. Виходячи з цього, Vicari et al. [34] припустили, що безпосередня роль гена *yaeQ*, що кодує глутаматсинтазу, полягає у транскрипційному контролі бактеріальної вірулентності.



**Рис. 4.** Потенційні РНК-термометри, що містять SD-послідовність у стеблі шпильки (виділено), та стартовий кодон ініціації (підкреслено): *a* – температура плавлення шпильки ( $t_{пл}$ ) становить 43,6 °С за іонної сили  $I = 0,2 \text{ M Na}^+$ . Вільна енергія Гіббса  $\Delta G = -2,0$  ккал/моль. Шпилькова структура локалізована в ділянці 5'-UTR гена *gltB*, що кодує попередник глутаматсинтети *S. enterica*. Червона смуга вказує на мРНК; *б* –  $t_{пл} = 44,9$  °С;  $\Delta G = -1,9$  ккал/моль. Шпилькова структура локалізована в ділянці 5'-UTR гена *yaeQ*, що кодує один з регуляторів вірулентності *S. enterica*; *в* – шпилькова структура локалізована в ділянці 5'-UTR гена, що кодує гіпотетичний протеїн.  $\Delta G = -9,3$  ккал/моль;  $z - t_{пл} = 42,0$  °С;  $\Delta G = -2,1$  ккал/моль. Шпилькова структура локалізована в ділянці 5'-UTR гена, що кодує гіпотетичну гідролазу, подібну до галогенокислої дегалогенази, *S. enterica*. Наведені шпилькові структури відповідають необхідним та достатнім умовам утворення РНК-термометрів, є висококонсервативними неканонічними структурами та знайдені в геномі всіх 25 проаналізованих ізолятів *Salmonella enterica*

Відомо, що для різних РНК-термометрів плавлення відбувається за різних температур: ROSE-термометр плавиться за 42 °С, а rfrA та lcrF-термометри – за 37 °С [35]. Тому як потенційні РНК-термометри нами використані шпилькові структури, температури плавлення яких знаходились у діапазоні 37–42 °С.

Для багатьох 5'-UTR-послідовностей доволі важко передбачити можливість їхнього функціонування в ролі РНК-термометрів. Для підтвердження роботи шпилькової структури як термодатчика необхідно провести експерименти, наприклад, тестуванням *in vivo* ефективності експресії репортерського гена за різних температур або плавленням шпилькової структури (до складу якої входить SD-послідовність). Вимірювання реальної температури плавлення визначених РНК-термометрів здійснюють, наприклад, за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму або УФ-спектроскопії. Оскільки температура плавлення нуклеїнових кислот залежить від іонної сили, при оцінці термодинамічних параметрів термометрів вважають, що концентрація іонів  $Mg^{2+}$  в інтервалі 1–2 мМ відповідає фізіологічному значенню всередині бактеріальних клітин.

Можливість функціонування знайдених шпилькових структур як термосенсорів в геномі *S. enterica* підтверджується тим фактом, що Neupert et al. [11] експериментально встановили функціонування як термосенсора шпилькової структури, повністю аналогічної одному із знайдених потенційних РНК-термометрів (рис. 4, в). Проведене авторами порівняння за фізіологічних умов ефективності роботи 12 синтетичних РНК-термометрів показало, що зазначений РНК-термометр (рис. 4, в) є одним з двох РНК-термометрів, найбільш ефективно контролюючих температурно залежну експресію гена *lacZ*, що кодує β-галактозидазу в *E. coli* [11]. Знайдені нами потенційні РНК-термометри (рис. 4) значно відрізняються своєю вторинною структурою. В той час як РНК-термометри характеризуються невеликою петлею (4–5 н.), експериментально підтверджений РНК-термометр (рис. 4, в) має доволі велику петлю, хоча всі знайдені шпилькові структури мають досконале стебло. Оскільки в роботі [11] встановлено, що шпильки, які значно різняться, однаково ефективно переключають

експресію гена, можна сподіватися, що й інші шпилькові структури (рис. 4) також виступатимуть в ролі РНК-термометрів.

Для перевірки надійності алгоритму визначення вторинних структур нами проведено моделювання вторинної структури у фрагменті мРНК *Saccharomyces cerevisiae*. Для фрагмента довжиною 74 п.н. у роботі Lu et al. [36] передбачено три варіанти вторинної структури, кожен з яких характеризується 19 канонічними парами нуклеотидів. Моделювання вторинної структури за допомогою пакета програм GeneVee підтверджує також можливість утворення 19 канонічних пар нуклеотидів. Таким чином, проведене тестування показало, що результати визначення вторинних структур добре узгоджуються з літературними даними, отже методику передбачення потенційних шпилькових структур можна вважати надійною.

Іншим підтвердженням надійності методики пошуку гіпотетичних рибоперемікачів, яку використовували в даній роботі, може служити їхнє наступне тестування. Взагалі, будь-які теоретичні дослідження можна вважати успішними тільки після їхньої експериментальної перевірки. Тому в рамках пілотного проекту нами проведено попередні експериментальні дослідження з перевірки низки РНК-термометрів в геномі *Salmonella enterica*, раніше теоретично визначених нами. Синтезовані нуклеотидні послідовності потенційних РНК-термометрів клонували в клітини *E. coli* поряд з 5'-кінцем гена, що кодує GFP, та провели декілька попередніх експериментів з температурного зсуву, спостерігаючи за зміною флуоресценції білка GFP в *E. coli*. При зміні температури з 22 до 37 °С реєстрували слабку індукцію GFP, проте не настільки сильну, яку спостерігали для синтетичних РНК-термометрів при температурно-контрольованій експресії генів в бактеріях.

Таким чином, на основі комп'ютерного та термодинамічного аналізу повністю секвенованих геномів 25 ізолятів *Salmonella enterica* встановлено алгоритм та критерії пошуку нових потенційних РНК-термометрів, що дозволить у подальшому провести пошук потенційних РНК-термометрів у геномі інших соціально значимих патогенів. Для *S. enterica* на додаток до відомого 4U-РНК-термометра визначено



шпилькові структури, які можуть бути новими РНК-термометрами. Вони відповідають необхідним та достатнім умовам утворення РНК-термометрів та є висококонсервативними неканонічними структурами, оскільки присутні в геномі всіх досліджених ізолятів *S. enterica*.

*Роботу частково підтримано Національною академією медичних наук України (грант АМН 95/2010). Автори висловлюють подяку рецензенту за критичні зауваження, ідеї та пропозиції, спрямовані на поліпшення статті.*

O.Yu. Limanskaya, L.A. Murtazaeva, A.P. Limanskii

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov  
E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

#### PUTATIVE TEMPERATURE SENSITIVE RIBOSWITCHERS IN SALMONELLA GENOME

Currently, a number of structurally and functionally different temperature-sensitive elements like as RNA thermometers which control a variety of biological processes of bacteria, including virulence, are known. Well-known RNA thermometers correspond to one long step-loop structure or few hairpins which can be matched or mismatched. Based on the computer and thermodynamical analysis of 25 isolates of *Salmonella enterica* with complete genome, algorithm and the criteria of search for putative RNA thermometers were developed. It will permit to perform the search of potential riboswitchers in genome of socially significant pathogens in the future. For *S. enterica*, in addition to well-known 4U RNA thermometer, four step-loop structures that may be new RNA thermometers were identified and two of them are localized in 5'-UTR of virulence regulators *gltB* and *yaеQ*. They correspond to necessary and sufficient conditions of RNA thermometer formation as far as these highly conservative structures are found in genome of all 25 isolates of *S. enterica*. Matched hairpins forming cruciform structure in supercoiled pUC8 plasmid were visualized by atomic force microscopy.

О.Ю. Лиманская, Л.А. Муртазаева, А.П. Лиманский

#### ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ В ГЕНОМЕ САЛЬМОНЕЛЛ

В настоящее время известен ряд структурно и функционально отличающихся температурочувствительных элементов – РНК-термометров, которые контролируют разнообразие биологических процессов бактерий, включая вирулентность. Известные РНК-термометры являются структурами, представляющими или одну протяженную шпильчатую структуру,

или несколько шпилек, которые могут быть как совершенными, так и несовершенными. На основе компьютерного и термодинамического анализа полностью секвенированных геномов 25 изолятов *Salmonella enterica* установлены алгоритмы и критерии поиска потенциальных РНК-термометров, что позволит в дальнейшем провести поиск потенциальных РНК-термометров в геноме других социально значимых патогенов. Для *S. enterica* в дополнение к известному 4U-РНК-термометру определены четыре шпильчатые структуры (две из них локализованы в 5'-нетранслируемой области регуляторов вирулентности *gltB* и *yaеQ*), которые могут быть новыми РНК-термометрами. Они соответствуют необходимым и достаточным условиям образования РНК-термометров и являются высококонсервативными неканоническими структурами, поскольку присутствуют в геноме всех исследованных изолятов *S. enterica*. Совершенные шпильки, образующие крестообразную структуру в суперспиральной плазмиде pUC8, визуализированы посредством атомно-силовой микроскопии.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Doudna J., Cech T. The chemical repertoire of natural ribozymes // Nature. – 2002. – **418**, № 6894. – P. 222–228.
2. Watson P., Fedor M. The glmS riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites in vivo // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2011. – **18**, № 3. – P. 359–363.
3. Narberhaus F., Vogel J. Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere // Mol. Microbiol. – 2009. – **74**, № 2. – P. 261–269.
4. Klinkert B., Narberhaus F. Microbial thermosensors // Cell Mol. Life Sci. – 2009. – **66**, № 16. – P. 2661–2676.
5. Morita M.T. Translational induction of heat shock transcription factor r32: evidence for a built-in RNA thermosensor // Genes Dev. – 1999. – **13**, № 6. – P. 655–665.
6. Lybecker M.C., Samuels D.S. Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi* // Mol. Microbiol. – 2007. – **64**, № 4. – P. 1075–1089.
7. Waldminghaus T., Fippinger A., Alfsmann J., Narberhaus F. RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria // Biol. Chem. – 2005. – **386**, № 12. – P. 1279–1286.
8. Waldminghaus T., Heidrich N., Brantl S., Narberhaus F. FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella* // Mol. Microbiol. – 2007. – **65**, № 2. – P. 413–424.
9. Hoe N.P., Goguen J.D. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein

- is thermally regulated // *J. Bacteriol.* – 1993. – **175**, № 24. – P. 7901–7909.
10. *Waldminghaus T., Gaubig L.C., Narberhaus F.* Genomewide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers // *Mol. Genet. Genom.* – 2007. – **278**. – P. 555–564.
  11. *Neupert J., Karcher D., Bock R.* Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli* // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – **36**, № 19. – P. e124.
  12. *Wieland M., Hartig J.S.* RNA quadruplex-based modulation of gene expression // *Chem. Biol.* – 2007. – **14**, № 7. – P. 757–763.
  13. *UNAFold*: software for nucleic acid folding and hybridization <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>.
  14. *Бродский Л.И., Драчев А.Л., Тамузов Р.Л., Чумаков К.М.* Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // *Biopolym. Cell.* – 1991. – **7**. – С. 10–14.
  15. *Limanskaya O., Limanskii A.* Imaging compaction of single supercoiled DNA molecules by atomic force microscopy // *General Physiol. and Biophys.* – 2008. – **27**, № 4. – P. 322–337.
  16. *Waldminghaus T., Fippinger A., Alfsmann J., Narberhaus F.* RNA thermometers are common in  $\alpha$ - and  $\gamma$ -proteobacteria // *Biol. Chem.* – 2005. – **386**. – P. 1279–1286.
  17. *Спиринов А.С.* Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. – М.: Высш. шк., 1986. – 303 с.
  18. *Chowdhury S., Maris C., Allain F.H., Narberhaus F.* Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer // *EMBO J.* – 2006. – **25**, № 11. – P. 2487–2497.
  19. *Lilley D.* Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA molecules // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1980. – **77**, № 11. – P. 6468–6472.
  20. *Sinden R., Pettijohn D.* Cruciform transitions in DNA // *J. Biol. Chem.* – 1984. – **259**, № 10. – P. 6593–6600.
  21. *Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S.* The absence of cruciform structures from pAO3 plasmid DNA in vivo // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* – 1984. – **2**, № 2. – P. 291–301.
  22. *Bevilacqua P.C., Blose J.M.* Structures, kinetics, thermodynamics, and biological functions of RNA hairpins // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2008. – **58**. – P. 79–103.
  23. *Кантор Ч., Шиммель П.* Биофизическая химия : Пер. с англ. Т. 3. Поведение биологических макромолекул. – М.: Мир, 1985. – 536 с.
  24. *Antao V.P., Tinoco I.Jr.* Thermodynamic parameters for loop formation in RNA and DNA hairpin tetraloops // *Nucl. Acids Res.* – 1992. – **20**, № 4. – P. 819–824.
  25. *Panyutin I., Lyamichev V., Lyubchenko Y.* A sharp structural transition in pAO3 plasmid DNA caused by increased superhelix density // *FEBS Lett.* – 1982. – **148**, № 2. – P. 297–301.
  26. *Panyutin I., Klishko V., Lyamichev V.* Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* – 1984. – **1**, № 4. – P. 1311–1324.
  27. *Зарудная М., Потягайло А., Говорун Д.* Консервативные структурные мотивы в 3'-нетранслируемой области геномной РНК вируса SARS-CoV // *Biopolym. Cell.* – 2003. – **19**, № 3. – С. 298–303.
  28. *Лиманский А.П.* Визуализация крестообразной структуры суперспиральной ДНК посредством атомно-силовой микроскопии // *Биофизика.* – 2000. – **45**, № 6. – С. 1039–1043.
  29. *De Smit M.H., van Duin J.* Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1990. – **87**. – P. 7668–7672.
  30. *Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – **18**, № 21. – P. 6409–6417.
  31. *Лиманская О.Ю., Лиманский А.П.* Визуализация элонгационных комплексов T7 РНК-полимеразы с помощью атомно-силовой микроскопии // *Молекуляр. биология.* – 2008. – **42**, № 3. – С. 533–542.
  32. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* S-форма ДНК – суперспиральная ДНК с 1.94–2.19 Е расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса // *Молекуляр. биология.* – 2006. – **40**, № 1. – С. 122–136.
  33. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминокислоте // *Биоорганич. химия.* – 2006. – **32**, № 5. – С. 494–510.
  34. *Vicari D., Artsimovitch I.* Virulence regulators RfaH and YaeQ do not operate in the same pathway // *Mol. Genet. Genom.* – 2004. – **272**, № 5. – P. 489–496.
  35. *Johansson J., Mandin P., Renzoni A. et al.* An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* // *Cell.* – 2002. – **110**. – P. 551–561.
  36. *Lu Z., Turner D., Mathews D.* A set of nearest neighbor parameters for predicting the enthalpy change of RNA secondary structure formation // *Nucl. Acids Res.* – 2006. – **34**, № 17. – P. 4912–4924.

Надійшла 29.03.12