

УДК 579.842'14:577.213'216

ПОИСК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РНК-ТЕРМОМЕТРОВ В ГЕНОМЕ *SALMONELLA ENTERICA*

© 2013 г. О. Ю. Лиманская*, **, ¹, Л. А. Муртазаева***, А. П. Лиманский*

*ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины”, Харьков, Украина

** Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”
Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина

*** Медицинский центр “Авиценна”, Симферополь, Украина

Поступила в редакцию 18.03.2012 г.

В настоящее время известен ряд структурно и функционально отличающихся температурно-чувствительных элементов – РНК-термометров, которые контролируют разнообразие биологических процессов бактерий, включая вирулентность. На основе компьютерного и термодинамического анализа полностью секвенированных геномов 25 изолятов *Salmonella enterica* установлены алгоритм 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 4 шпилечные структуры, 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 25 изолятов *S. enterica*. Шпильки, образующие крестообразную структуру в суперспиральной ДНК pUC8, визуализированы посредством атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: РНК-термометр, последовательность Шайн-Дальгарно, шпилечная структура, *Salmonella enterica*, АСМ, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.7868/S0026365613010060

Свободно живущие микроорганизмы периодически подвергаются изменению условий внешней среды – температуры, рН, концентрации питательных веществ. Для предотвращения последствий температурных колебаний у бактерий развита сложная сеть защитных механизмов – в качестве потенциальных температурно-чувствительных элементов в природе используются различные клеточные компоненты от мембраны до белков, молекул ДНК и РНК.

Патогенные микроорганизмы часто реагируют на температуру около 37°C индукцией экспрессии генов вирулентности. Регуляция экспрессии генов, контролирующей среду, может осуществляться на уровне транскрипции посредством взаимодействия с регуляторными протеинами. Однако недавно открыто несколько посттранскрипционных механизмов, основанных на функционировании молекул РНК [1]. Показано, что определенные молекулы тРНК не только поставляют субстрат для рибосом, но и содержат контрольные

элементы, которые модулируют их собственную экспрессию зависимым от условий среды образом. Структурные изменения в таких сенсорных РНК обусловлены специфичными изменениями окружающей среды.

Различают два принципиально разных класса РНК: цис-действующие РНК-элементы, регуляторный потенциал которых находится внутри последовательности мРНК, и транс-действующие, малые, некодирующие молекулы РНК, которые функционируют посредством спаривания нуклеотидов с комплементарными последовательностями мРНК, локализованными в других локусах генома [2]. В отличие от классических аттенуаторов, которые регулируют структуру лидерной последовательности РНК в соответствии с позицией транслирующей рибосомы, цис-действующие РНК изменяют свою конформацию в ответ на физические или химические сигналы. Так называемые рибопереклюватели осуществляют мониторинг метаболического состояния клетки посредством связывания с высокой специфичностью и афинностью с метаболитами. Они локализованы в

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: olga.limanskaya@mail.ru).

области 5'-UTR (untranslated region – нетранслируемая область) генов, кодирующих биосинтез, поглощение или деградацию малых метаболитов, и обеспечивают контроль обратной связи для этих путей метаболизма. Связывание малой молекулы толкает конформационный переключатель, изменяющий экспрессию гена одним из трех возможных механизмов: а) преждевременной терминацией транскрипции; б) инициацией трансляции или в) процессингом мРНК. Большинство рибопереклюателей выключают экспрессию в связанном состоянии. Тем не менее найдено незначительное количество переключателей, включающих экспрессию генов.

В отличие от высокоспецифичных рибопереклюателей, связывающихся с метаболитами, РНК-термометры – близкородственный тип сенсорных мРНК – действуют в ответ на общий физический сигнал, а именно на внутриклеточную температуру, которая является важным параметром, влияющим, в частности, на экспрессию генов, кодирующих протеины теплового и холодового шока, и генов вирулентности, и находится под постоянным контролем дуплексов (образуемых, например, стеблем шпильки РНК-термометра). Хорошо известной особенностью нуклеиновых кислот является то, что они плавятся при повышении температуры. Следовательно, сдвиг температуры может модулировать конформацию регуляторных молекул РНК, т.е. переход фрагментов молекулы от конформации внутримолекулярной шпильки к однонитевому состоянию.

В настоящее время известен ряд структурно и функционально отличающихся РНК-термометров, которые контролируют разнообразие клеточных процессов. Все открытые молекулярные термометры, которые могут быть цис- или трансдействующими, осуществляют контроль трансляции посредством изоляции участка, связывающегося рибосому, и большинство из них локализовано в 5'-UTR бактериальных генов теплового шока или генов вирулентности. При низкой температуре последовательность Шайн-Дальгарно (SD-последовательность; 5'-aaggag-3'; 5'-rraggak-3' – консенсусная последовательность для прокариот; 5'-uugcu-3' – для грамотрицательных бактерий) [2] маскируется (находится внутри шпилечной структуры). Повышение температуры дестабилизирует шпилечную структуру таким образом, что сайт связывания рибосомы (SD-последовательность) становится доступным, что разрешает инициацию трансляции (AUG – стартовый кодон инициации трансляции).

Первый РНК-термометр, действующий через механизм плавления, найден в гене *rpoH* *E. coli*, который кодирует альтернативный сигма-фактор σ^{32} , или RpoH [3]. Альтернативный сигма-фактор RpoS играет центральную роль в регуляции ассо-

циированных с вирулентностью внешних поверхностных протеинов OspC и OspA при заболевании Лайма (Lyme disease), вызванном спирохетой *Borrelia burgdorferi*. Температура является одним из ключевых параметров внешней среды, контролируемым RpoS, а небольшая некодирующая молекула РНК, DsrA_{Bb}, регулирует увеличение количества RpoS в результате изменения температуры. В работе [4] была высказана гипотеза, что DsrA_{Bb} находится в стабильной двунитевой структуре при $T = 23^{\circ}\text{C}$, при которой не происходит спаривания нуклеотидов с rpoS-транскриптом. После повышения температуры вторичная структура молекулы РНК ввиду плавления разрушается, что ведет к связыванию анти-SD-области *rpoS* мРНК. Это может стимулировать трансляцию путем выхода SD-последовательности и сайта инициации трансляции из двунитевой структуры в *rpoS* мРНК в условиях инициации вирулентности (37°C).

Возможно, наиболее распространенным бактериальным РНК-термометром является ROSE-элемент (Repression Of heat-Shock gene Expression), который подавляет экспрессию генов теплового шока. Он был найден в многочисленных α - и β -протеобактериях, в том числе *E. coli* и *Salmonella enterica* [5]. ROSE-элемент, имея длину от 60 до 100 нуклеотидов (н.), локализован, как правило, в 5'-UTR генов теплового шока. Его довольно сложная вторичная структура включает 2–4 шпилечные структуры, одна из которых содержит SD-последовательность и, в некоторых случаях, также стартовый кодон AUG. Другим широко распространенным термосенсором является 4U-РНК-термометр, который сначала был найден в малом гене *agsA*, гене теплового шока, *S. enterica* [6]. Предсказанная структура содержит две шпильки, при этом четыре уридиновых остатка образуют нуклеотидные пары с SD-последовательностью (рис. 1). Экспериментально подтверждено зависимое от температуры плавление одной из шпилек, а связывание рибосомы с SD-последовательностью происходит только при температурах теплового шока.

4U-РНК-термометр часто используют для контроля генов теплового шока и вирулентности бактерий, поскольку он может связываться с фрагментом 5'-agga-3' SD-последовательности [6]. Так, полностью подтверждена гипотеза контроля с помощью РНК-термометра для гена *lcrF* (*virF*) *Yersinia* sp., который кодирует регулятор отклика вирулентности [7]. Экспрессия гена не происходит при температуре 26°C , но индуцируется при 37°C .

Анализ регуляторных принципов известных РНК-термометров показал, что для их функционирования необходимо, чтобы несколько нуклеотидов образовывали комплементарные связи с

нуклеотидами SD-последовательности или фланкирующей области для предотвращения связывания рибосомы. Это означает, что в природе должны существовать другие, еще неизвестные типы РНК-термометров. И с помощью биоинформатического анализа получены подтверждения этой гипотезы [8]. Синтез эффективных искусственных РНК-термометров стал другим доказательством этого предположения [9, 10]. Но во многих случаях молекулярные детали механизма чувствительности бактерий к изменениям температуры являются еще неполностью понятными.

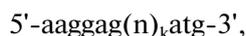
Результаты проведенного нами компьютерного анализа секвенированных последовательностей хромосомной ДНК различных изолятов *S. enterica* из баз данных свидетельствуют об отсутствии 4U-РНК-термометров, аналогичных предсказанному авторами работы [6] (рис. 1) для гена *agsA S. enterica* и подтвержденному в экспериментах *in vivo* и *in vitro* для трех из 25 анализируемых изолятов (номера NC_011147, NC_011274, NC_006511). Необходимость выживать и реплицироваться в различных условиях, включая температурные колебания, в том числе, между внешней средой и организмом хозяина, приводит к возникновению у патогенов соответствующих механизмов регуляции экспрессии генов, к элементам которых относятся РНК-термометры. Отсутствие 4U-РНК-термометров в некоторых изолятах сальмонелл указывает на возможность существования в них термочувствительных элементов, отличающихся от 4U-РНК-термометров и, возможно, ROSE-элементов.

В данной работе проведен поиск новых, ранее неизвестных, потенциальных РНК-термометров в последовательностях хромосомной ДНК изолятов грамотрицательной бактерии *Salmonella enterica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск шпилечных структур. Для компьютерного анализа были выбраны полностью секвенированные последовательности хромосомной ДНК 25 изолятов *S. enterica*, представленные на момент проведения исследований в базе данных GenBank.

Поиск фрагментов хромосомной ДНК бактерий с потенциалом образования шпилечных структур осуществляли по формуле:



где aaggag – SD-последовательность, n – любой из возможных нуклеотидов, k = 6–10, atg – сайт инициации трансляции (использовали также альтернативные сайты инициации трансляции ttg и gtg).

Кроме того, для поиска гипотетических 4U-РНК термометров в секвенированных последова-

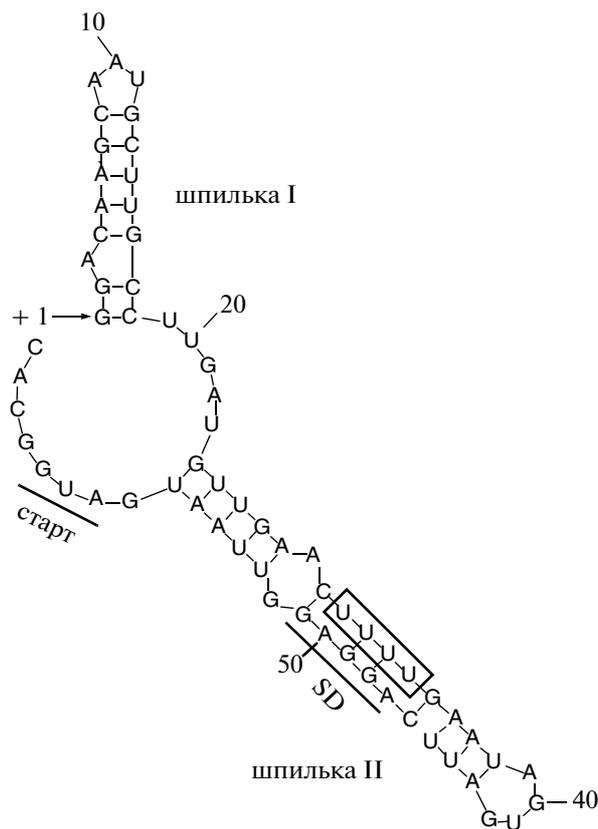


Рис. 1. Вторичная структура, содержащая предсказанный и подтвержденный 4U-РНК-термометр в гене *agsA Salmonella enterica* [6] при $T = 20^\circ\text{C}$. Выделена последовательность Shine-Dalgarno, находящаяся в стебле шпильки, и сайт инициации трансляции.

тельности + и – нитей хромосомной ДНК *S. enterica* использовали следующие формулы:



Найденные последовательности анализировали на соответствие приведенным выше критериям.

Для предсказания вторичной структуры найденных линейных фрагментов ДНК и соответствующих им РНК-транскриптов, а также определения температуры плавления потенциальных шпилек при физиологической ионной силе ($I = 0.2 \text{ M Na}^+$, $[\text{Mg}]^{2+} = 0.0 \text{ mM}$ или $I = 0.15 \text{ M Na}^+$, $[\text{Mg}]^{2+} = 0.2 \text{ mM}$) использовали программу Mfold (версия 3.2) [11]. Дополнительно для построения шпилечных структур использовали программу RNA2 пакета программ GeneVee [12].

Атомно-силовая микроскопия. Для визуализации суперспиральной молекулы ДНК pUC8 (длина 2665 п.н.) в воздухе использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope III с D-сканером ("Veeco Instruments Inc.", США). АСМ-изображения ДНК были записаны с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме "высота" с использованием стандартных незаостренных

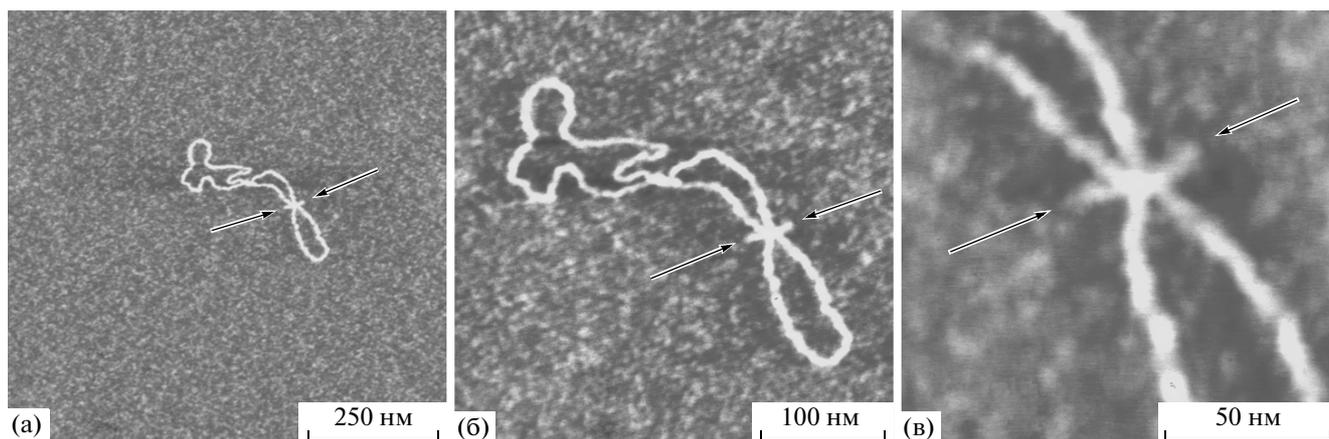


Рис. 2. АСМ-изображение суперспиральной плазмиды pUC8 (длиною 2665 п.н.) в воздухе. Размер кадра: а — 858 × 858 нм; б — 372 × 372 нм; в — 134 × 134 нм. Стрелками показаны две шпильки, образующие крестообразную структуру.

зондов (ЗАО “НТ-МДТ”, Российская Федерация) с резонансной частотой 300–360 кГц. Процедуру получения аминокислоты осуществляли с помощью модификации свежесколотой слюды аминокислотными группами в парах перегнанного 3-аминопропилтриэтоксисилана, полученного от “Aldrich” (США). Технология модификации детально описана ранее [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени экспериментальное подтверждение функционирования ROSE-термометров получено всего лишь для нескольких из 40 предсказанных для протеобактерий. Возможность существования 4U-РНК-термометров показана для гена *dnaJ Brucella melitensis* и области, предшествующей гену *groES Staphylococcus aureus*; однако пока неясно, будут ли они функционировать в качестве РНК-термометров [6].

Анализ особенностей структурной организации экспериментально подтвержденных РНК-термометров позволил нам разработать алгоритм поиска соответствующих фрагментов в последовательностях хромосомной ДНК прокариот и, следовательно, РНК-транскриптов, одним из элементов которых является расстояние между SD-последовательностью, входящей в состав шпилечной структуры, и сайтом инициации трансляции, составляющее от 6 (для ROSE-элементов) до 12 (для 4U-термометров) нуклеотидов. В качестве основных критериев потенциальных РНК-термометров использовали следующие: (i) температура плавления шпилечной структуры — в диапазоне 37–43°C (при физиологической ионной силе); (ii) последовательность Шайн-Дальгарно полностью или частично находится в стебле шпилечной структуры; (iii) иницирующими являются канонический кодон AUG (ATG — для ДНК), с кото-

рого у прокариот начинаются почти 90% всех кодирующих последовательностей, а также альтернативные кодоны GUG, UUG (GTG, TTG — для ДНК) [14].

Известные РНК-термометры являются структурами, представляющими собой либо одну протяженную шпильку, либо несколько шпилечных структур. Как показали результаты ЯМР-исследований, стебель шпилечной структуры, включающей ROSE-элемент, содержит несколько неканонических пар нуклеотидов [15], поэтому при поиске гипотетических РНК-термометров нами были проанализированы как совершенные, так и несовершенные шпилечные структуры.

Ранее для суперспиральных ДНК, содержащих палиндром, было установлено, что при физиологических условиях возможно образование шпилечной структуры как фрагмента крестообразной структуры с длиной стебля не менее 7 п.н. и петель, размер которой не превышает 4–5 нуклеотидов [16–18]. Длина стебля шпилечных структур, образующихся, например, в 16S rRNA, в среднем составляет 3–4 п.н., достигая 10 п.н. [19], а энергетически наиболее выгодной для шпилечных структур в молекулах РНК является петля из 6–7 нуклеотидов [20]. При этом методом термической денатурации показано, что шпилечные структуры в РНК являются более стабильными по сравнению с соответствующими структурами, образующимися в ДНК [21]. Исходя из литературных данных, полученных в экспериментах как *in vivo*, так *in vitro* [22–25], и учитывая, что шпилечные структуры, включающие SD-последовательность, эффективно влияют на трансляцию только в том случае, если их свободная энергия составляет около –6 ккал/моль [26], для дальнейшего анализа были выбраны шпилечные структуры, длина петли которых не превышала, как правило, восьми нуклеотидов, длина стебля — 7 п.н., а свободная энергия ΔG составляла приблизительно

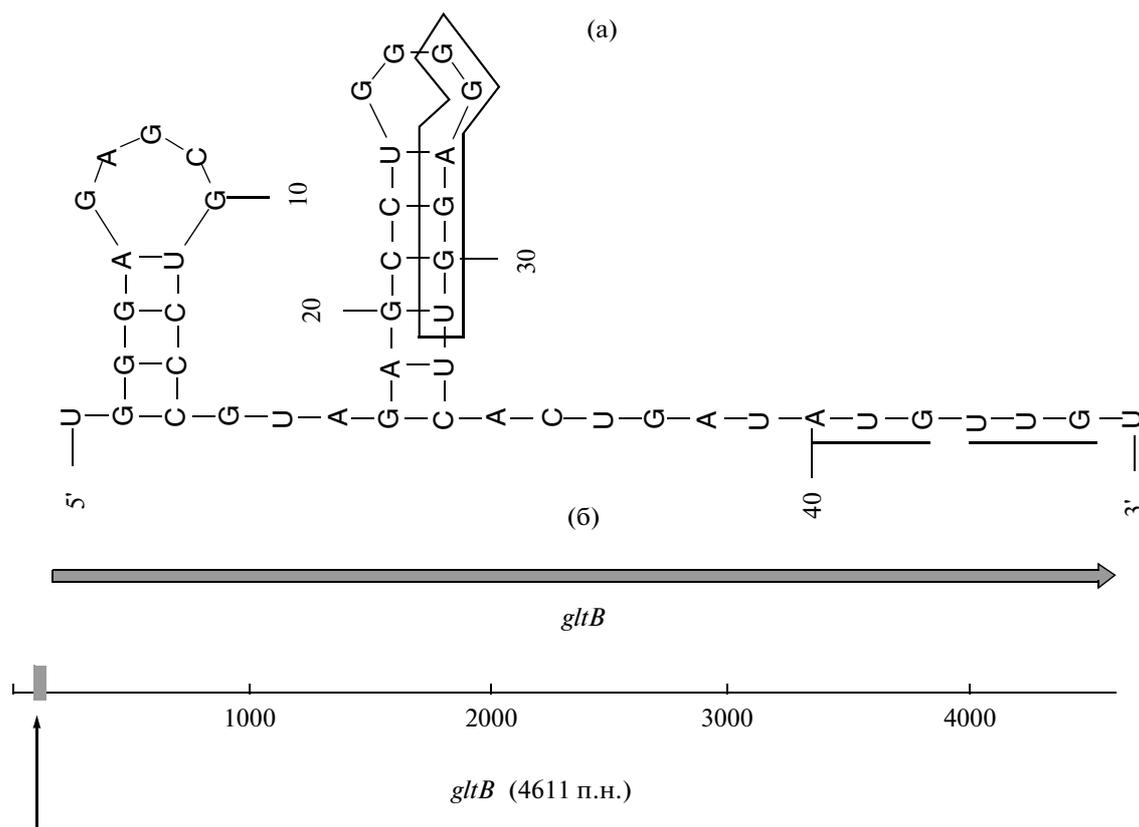


Рис. 3. а – Потенциальный РНК-термометр 1, содержащий SD-последовательность в стебле шпильки (выделено) и стартовый кодон инициации (подчеркнуто). Температура плавления шпильки ($T_{пл}$) составляет 43.6°C при ионной силе $I = 0.2 \text{ M Na}^+$. Свободная энергия Гиббса $\Delta G = -2.0$ ккал/моль. Данная шпильчатая структура соответствует необходимым и достаточным условиям образования РНК-термометров и присутствует в геноме всех 25 проанализированных изолятов *S. enterica*. б – Локализация шпильчатой структуры, образующей РНК-термометр 1, в области 5'UTR гена *gltB*, кодирующего предшественника глутаматсинтетазы *S. enterica*. Полоса указывает на мРНК.

-6 ккал/моль. Дополнительно рассматривали локализацию потенциальных шпилек по отношению к генам белков теплового шока *hsp*.

Визуализация шпильчатых структур в суперспиральной ДНК. Преимущества объединения методики иммобилизации ДНК на аминоклюдое с возможностями АСМ позволили нам визуализировать крестообразную структуру, образованную шпильками, суперспиральной ДНК рUC8. АСМ-изображение ДНК рUC8 на аминоклюдое (рис. 2), показывает, что шпильки выглядят как резко очерченные выступы на нитях ДНК с длиной, которую можно оценить непосредственно из АСМ-изображения. Анализ наших экспериментальных результатов показал, что в образовании шпильки участвуют 11–12 п.н., а термодинамический анализ инвертированных повторов подтвердил, что шпилька образована 26 нуклеотидами и ее свободная энергия ΔG составляет -17.8 ккал/моль.

Отметим, что при визуализации посредством АСМ молекулы РНК в большинстве исследований выглядят как конденсированные структуры. Ранее нами были визуализированы РНК-тран-

скрипты, иммобилизованные на слюде, которые образуют жгутоподобные конденсированные структуры длиной 122 ± 10 нм с соотношением длины и ширины 4.5–5 [27]. По нашему мнению, для визуализации вытянутых неконденсированных молекул РНК, содержащих шпильчатые структуры, необходимо изменить поверхностные свойства субстрата (слюды). Отмеченные морфологические особенности молекул РНК, визуализированных с помощью АСМ, объясняются, по нашему мнению, значительным влиянием поверхностных свойств слюды, на которой РНК-транскрипты иммобилизованы. В свою очередь, поверхностные свойства субстрата определяются гидрофобностью и плотностью катионов, локализованных на поверхности слюды. Дело в том, что для визуализации молекул РНК используют ту же слюду, что и для визуализации молекул ДНК, т.е. слюду с такой гидрофобностью и поверхностной плотностью катионов, при которой линейные и суперспиральные двухцепочечные молекулы ДНК не образуют конденсированные структуры при иммобилизации на поверхности

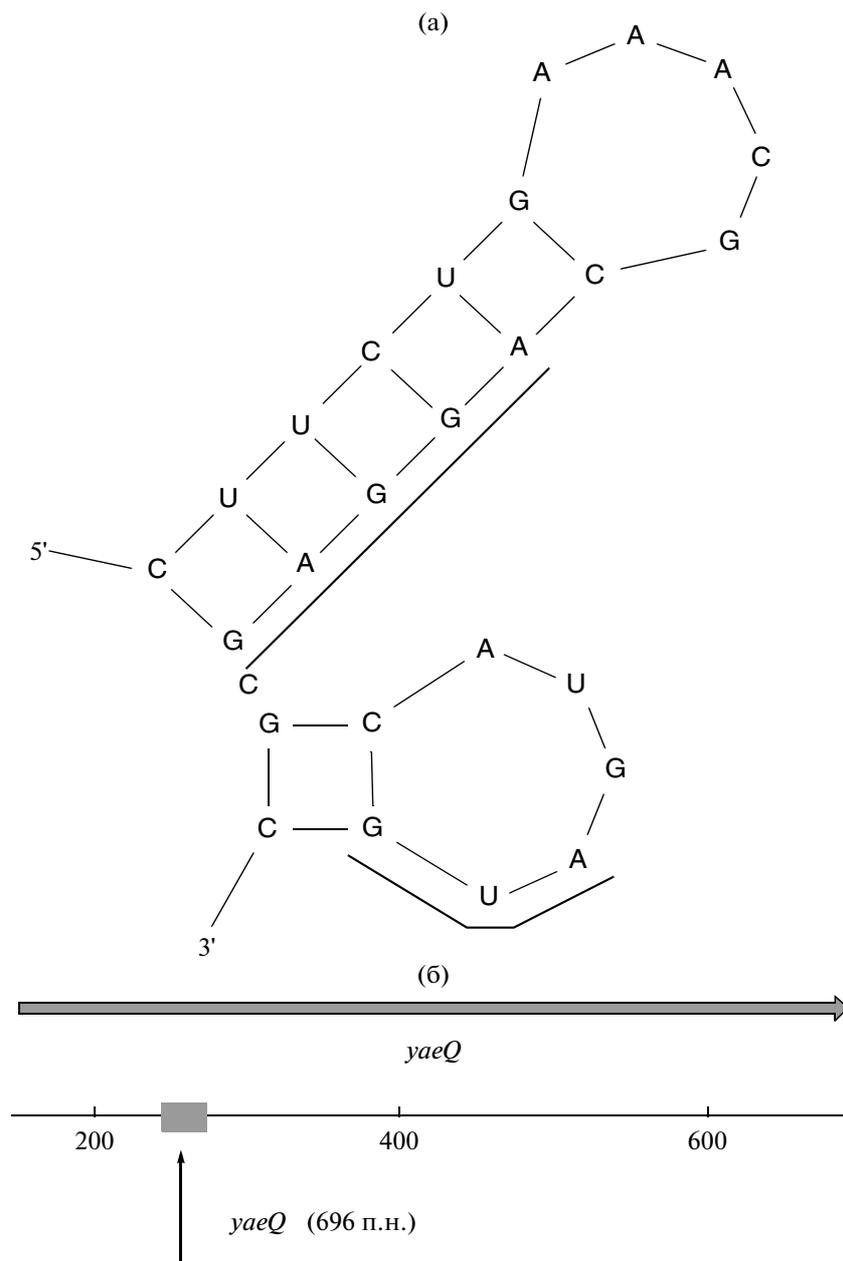


Рис. 4. а – Потенциальный РНК-термометр 2, содержащий SD-последовательность в стебле шпильки (выделено). Подчеркнут стартовый кодон инициации трансляции. $T_{пл} = 44.9^{\circ}\text{C}$ при ионной силе $I = 0.2 \text{ M Na}^+$; $\Delta G = -1.9$ ккал/моль. Данная шпильчатая структура соответствует необходимым и достаточным условиям образования РНК-термометров и присутствует в геноме всех 25 проанализированных изолятов *S. enterica*. б – Локализация шпильчатой структуры в области 5'UTR гена *yaeQ*, кодирующего консервативный гипотетический протеин *S. enterica*.

слюды, а характеризуются равномерным распределением фрагментов ДНК. Ранее нами было показано, что даже незначительное изменение гидрофобности и плотности катионов поверхности слюды приводит к значительному изменению морфологии иммобилизованных молекул ДНК [28, 29].

Потенциальные шпильчатые структуры в геноме *S. enterica*. Поскольку термометры могут быть ло-

кализованы в любом локусе молекулы РНК, для поиска шпилек, основных компонентов новых потенциальных РНК-термометров, отличающихся от известных 4U-РНК-термометров, на первом этапе нами были проанализированы последовательности хромосомной ДНК трех изолятов *S. enterica*, не содержащих 4U-РНК-термометр.

Проведенный компьютерный и термодинамический анализ изолята *S. enterica* с полностью се-

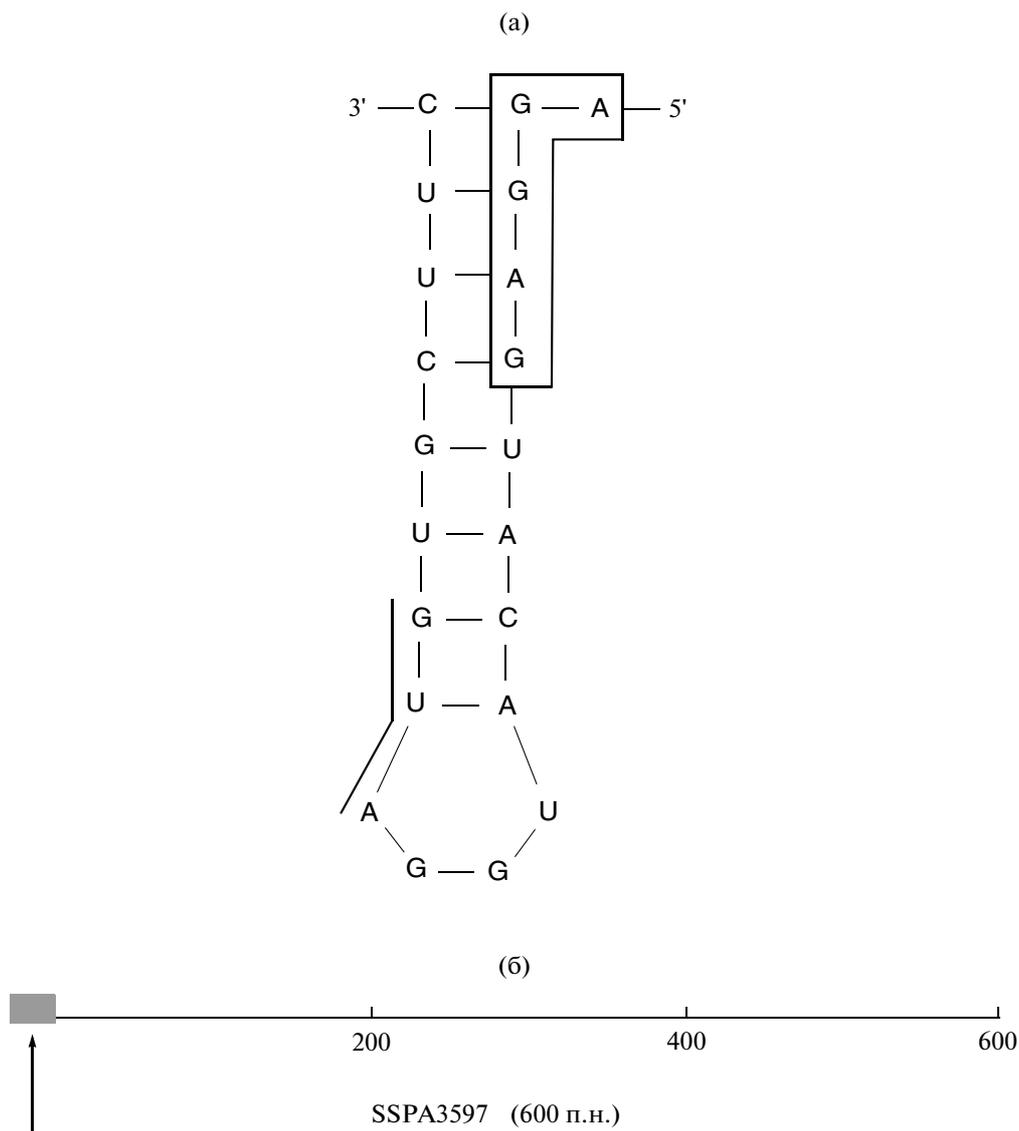


Рис. 5. а – Потенциальный РНК-термометр 3, локализованный в области, прилегающей к 5'UTR гена, кодирующего гипотетический протеин. $T_{пл} = 42.0^{\circ}\text{C}$ при ионной силе $I = 0.2 \text{ M Na}^+$; $\Delta G = -2.1$ ккал/моль. б – Локализация шпильчатой структуры по отношению к 5'UTR гена, кодирующего гипотетическую гидролазу, подобную галогенокислой дегалогеназе, *S. enterica*.

квенированным геномом (номер FM 200053 для GenBank) позволил выявить 4 шпильчатые структуры (рис. 3–6), которые удовлетворяют необходимым условиям потенциального РНК-термометра – наличие (а) последовательности Шайн-Дальгарно, (б) сайта инициации трансляции, расположенного на расстоянии не более 15 н., а также (в) соответствующей температуры (около 40–42°C) плавления шпильки и (г) локализация в области 5'-UTR. Наличие известных 13-ти генов теплового шока (с одним из которых сцеплен 4U-РНК-термометр) в изоляте FM200053 позволяет предположить, что в геноме сальмонелл могут существовать несколько типов РНК-термометров, а

не только один, в настоящее время известный как 4U РНК-термометр.

Важно, что шпильчатые структуры (рис. 3–6) не только отвечают необходимым и достаточным условиям образования РНК-термометров, но и являются высококонсервативными неканоническими структурами – они присутствуют в геноме всех 25 проанализированных изолятов *S. enterica*.

Известно, что для различных РНК-термометров плавление происходит при разных температурах. Например, ROSE термометр плавится при 42°C, а pfrA- и lcrF-термометр – при 37°C [30]. Поэтому к рассмотрению в качестве потенциальных РНК-термометров нами были приняты шпи-

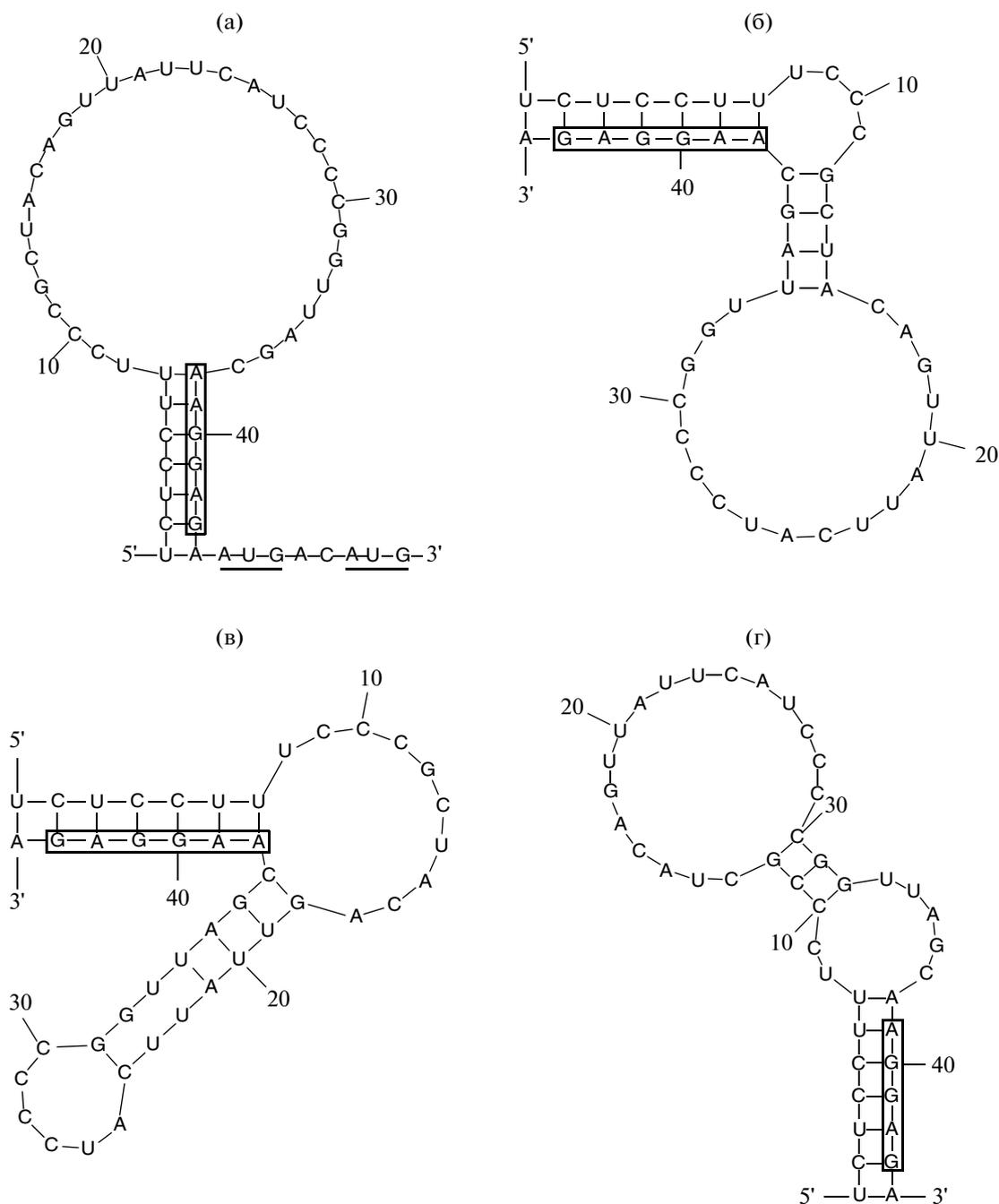


Рис. 6. Потенциальный РНК-термометр 4, локализованный в области 5'UTR гена, кодирующего гипотетический протеин. Выделены SD-последовательность и сайт инициации трансляции. Вторичные структуры (а–г) отличаются свободной энергией Гиббса шпильки и всей структуры. ΔG шпильки, содержащей SD-последовательность, составляет -5.6 ккал/моль, а петля длиной 30 н. образуется только при принудительном распаривании (а); -9.3 ккал/моль (б); -8.2 ккал/моль (в); 8.1 ккал/моль (г).

лечные структуры, температуры плавления которых находились в диапазоне $37-42^\circ\text{C}$.

Для многих фрагментов 5'-UTR последовательностей довольно трудно точно предсказать возможность их функционирования в качестве РНК-термометров. Для подтверждения работы

шпилечной структуры в качестве термоматчика необходимо провести эксперименты, например, с помощью тестирования *in vivo* эффективности экспрессии репортерного гена при различных температурах или посредством плавления шпилечной структуры (в состав которой входит SD-последовательность).

довательность). Измерение реальной температуры плавления определенных РНК-термометров осуществляют, например, с помощью спектроскопии кругового дихроизма или УФ-спектроскопии. Поскольку температура плавления нуклеиновых кислот зависит от ионной силы, при оценке термодинамических параметров термометров считают, что концентрация ионов Mg^{2+} в интервале 1–2 мМ соответствует физиологическому значению внутри бактериальных клеток.

Возможность функционирования найденных шпилечных структур в качестве термосенсоров в геноме *S. enterica* подтверждается тем фактом, что в работе [9] экспериментально установлено функционирование в качестве термосенсора шпилечной структуры, полностью аналогичной потенциальному РНК-термометру № 4 (рис. 6а). Проведенное авторами работы [9] сравнение при физиологических условиях эффективности работы 12 синтетических РНК-термометров показало, что данный РНК-термометр (рис. 6а) является одним из двух РНК-термометров, наиболее эффективно контролирующими температурно зависимую экспрессию гена *lacZ*, кодирующего β-галактозидазу в *E. coli*. Найденные нами потенциальные РНК-термометры (рис. 3–6) значительно отличаются своей вторичной структурой. В то время как РНК-термометры (рис. 3–5) характеризуются небольшой петлей (4–5 н.), экспериментально подтвержденный РНК-термометр № 4 (рис. 6а) имеет довольно большую петлю (30 н.), хотя все найденные шпилечные структуры имеют совершенный стебель. Поскольку в работе [9] найдено, что значительно различающиеся шпильки могут одинаково эффективно переключать экспрессию гена, можно надеяться, что и другие шпилечные структуры (рис. 3–5) также могут выступать в роли РНК-термометров.

Таким образом, в данной работе на основе компьютерного и термодинамического анализа полностью секвенированных геномов 25 изолятов *S. enterica* установлены алгоритм и критерии поиска потенциальных РНК-термометров, что позволит в дальнейшем провести аналогичный скрининг РНК-термометров в геноме других социально значимых патогенов. Для *S. enterica*, в отличие от известного 4U РНК-термометра, определены шпилечные структуры, 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 25 изолятов *S. enterica*.

Работа частично поддержана Национальной академией медицинских наук Украины (грант АМН 95/2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Narberhaus F., Vogel J. Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. № 2. P. 261–269.
2. Klinkert B., Narberhaus F. Microbial thermosensors // *Cell Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. № 16. P. 2661–2676.
3. Morita M.T. Translational induction of heat shock transcription factor r32: evidence for a built-in RNA thermosensor // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 6. P. 655–665.
4. Lybecker M.C., Samuels D.S. Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 64. № 4. P. 1075–1089.
5. Waldminghaus T., Fippinger A., Alfsmann J., Narberhaus F. RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria // *Biol. Chem.* 2005. V. 386. № 12. P. 1279–1286.
6. Waldminghaus T., Heidrich N., Brantl S., Narberhaus F. FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. № 2. P. 413–424.
7. Hoe N.P., Goguen J.D. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 24. P. 7901–7909.
8. Waldminghaus T., Gaubig L.C., Narberhaus F. Genome-wide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers // *Mol. Genet. Genomics.* 2007. V. 278. P. 555–564.
9. Neupert J., Karcher D., Bock R. Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli* // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 19. P. e124.
10. Wieland M., Hartig J.S. RNA quadruplex-based modulation of gene expression // *Chem. Biol.* 2007. V. 14. № 7. P. 757–763.
11. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>
12. Бродский Л.И., Драчев А.Л., Тамузов Р.Л., Чумаков К.М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // *Биополимеры и клетка.* 1991. Т. 7. С. 10–14.
13. Limanskaya O., Limanskii A. Imaging compaction of single supercoiled DNA molecules by atomic force microscopy // *Gen. Physiol. Biophys.* 2008. V. 27. № 4. P. 322–337.
14. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высшая школа, 1986. 303 с.
15. Chowdhury S., Maris C., Allain F., Narberhaus F. Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 2487–2497.
16. Lilley D. Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. № 11. P. 6468–6472.
17. Sinden R., Pettijohn D. Cruciform transitions in DNA // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 10. P. 6593–6600.
18. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. The absence of cruciform structures from pAO3 plasmid DNA in

- vivo* // J. Biomol. Struct. & Dyn. 1984. V. 2. № 2. P. 291–301.
19. *Bevilacqua P., Blose J.* Structures, kinetics, thermodynamics, and biological functions of RNA hairpins // Annu. Rev. Phys. Chem. 2008. V. 58. P. 79–103.
 20. *Кантор Ч., Шиммель П.* Биофизическая химия. Т. 3. Поведение биологических макромолекул. М.: Мир, 1985. 536 с.
 21. *Antao V., Tinoco I.* Thermodynamic parameters for loop formation in RNA and DNA hairpin tetraloops // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 4. P. 819–824.
 22. *Panyutin I., Lyamichev V., Lyubchenko Y.* A sharp structural transition in pAO3 plasmid DNA caused by increased superhelix density // FEBS Lett. 1982. V. 148. № 2. P. 297–301.
 23. *Panyutin I., Klishko V., Lyamichev V.* Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. 1984. V. 1. № 4. P. 1311–1324.
 24. *Зарудная М., Потягайло А., Говорун Д.* Консервативные структурные мотивы в 3'-нетранслируемой области геномной РНК вируса SARS-CoV // Биополимеры и клетка. 2003. Т. 19. № 3. С. 298–303.
 25. *Лиманский А.П.* Визуализация крестообразной структуры суперспиральной ДНК посредством атомно-силовой микроскопии // Биофизика. 2000. Т. 45. № 6. С. 1039–1043.
 26. *De Smit M., van Duin J.* Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7668–7672.
 27. *Лиманская О.Ю., Лиманский А.П.* Визуализация элонгационных комплексов T7 РНК-полимеразы с помощью атомно-силовой микроскопии // Мол. биология. 2008. Т. 42. № 3. С. 533–542.
 28. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* S-форма ДНК – суперспиральная ДНК с 1.94–2.19 Å расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса // Мол. биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 122–136.
 29. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминокислоте // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. № 5. С. 494–510.
 30. *Johansson J., Mandin P., Renzoni A., Chlaruttini C., Springer M., Cossart P.* An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* // Cell. 2002. V. 110. P. 551–561.