



УДК 577.112.083

## Полинуклеотид фосфорилаза Pnp и экзонуклеаза Rnr *Escherichia coli*, выделенные специфической сорбцией на нуклеиновые кислоты, процессируют РНК-продукты «промоторных островков»

Тутукина М.Н., Пуртов Ю.А., Швырева У.С., Быков А.А.,  
Шавкунов К.С., Глазунова О.А., Озолин О.Н.

ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пушchino

Поступила в редакцию 01.07.2016 г.

Иммобилизованные на магнитных шариках короткие РНК *E. coli* были использованы для специфической сорбции белков клеточного лизата. Методом LC/MS спектрометрии был выявлен набор связывающихся белков, включающий экзонуклеазу Pnp. Исследована способность Pnp и РНКазы специфического процессинга Rnr влиять на количество коротких и длинных РНК, синтезируемых с обогащённых промоторами участков генома. Делеция гена *rnr* увеличивала количество всех исследованных РНК в бактериальных клетках, а делеция *pnp* влияла на продукты 3 из 4 геномных областей. Посттранскрипционный процессинг, следовательно, важен для генезиса исследованных РНК, что делает возможным их участие в каких-то клеточных процессах.

**Ключевые слова:** *E. coli*, «промоторные островки», олигонуклеотиды, короткие РНК бактерий, сорбция на магнитные шарики, LC/MS спектроскопия.

## Polynucleotide phosphorylase Pnp and exonuclease Rnr, isolated by specific sorption on nucleic acids, process RNA products derived from «promoter islands»

Tutukina M.N., Purtov Yu.A., Shvyreva U.S., Bykov A.A., Shavkunov K.S.,  
Glazunova O.A., Ozoline O.N.

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Oligonucleotides synthesized from promoter-rich regions of the bacterial genome («promoter islands») were studied. Despite multiple sites for potential transcription initiation in their sequences, short oligonucleotides rather than full-size RNAs are the main products originating from the «islands». This anomaly may be due to the peculiarities of the structural and functional organization of the «islands» and/or targeted post-transcriptional processing of synthesized products. To assess the second possibility, a fraction of purified biotinylated short RNAs of *Escherichia coli* was immobilized on magnetic beads and used for specific sorption of proteins from bacterial cell lysate. LC/MS spectrometry revealed a number of proteins capable of strong binding to small RNAs, and among them was polynucleotide phosphorylase Pnp. The potentiality of this nuclease and RNase Rnr, which was identified previously among proteins specifically sorbed on fragments of «promoter islands», to affect the intracellular contents of short and long «island»-derived RNAs was studied by real-time RT-PCR. It turned out that *rnr* deletion results in an increase in the amount of all studied types of RNA in bacterial cells, while deletion of *pnp* affected the intracellular level of three out of four model samples. Thus, posttranscriptional processing plays an important role in the genesis of «island» RNA products, which can realize certain functions, yet to be elucidated.

**Keywords:** *E. coli*, «promoter islands», oligonucleotides, bacterial small RNAs, sorption on magnetic beads, LC/MS spectroscopy.

## Введение

Участки, обогащенные потенциальными промоторами, были обнаружены в геноме *Escherichia coli* с использованием алгоритма поиска промоторов PlatProm и получили название «промоторных островков» [1-5]. Анализ их распределения в геноме выявил частую ассоциацию с генами, полученными кишечной палочкой в результате горизонтального переноса [6, 7]. Поэтому исследование особенностей функционирования «островков» имеет особое значение для понимания механизмов эволюции прокариотических геномов. Самой яркой особенностью «островков» является их способность эффективно связывать РНК-полимеразу с образованием открытых комплексов при очень низкой способности инициировать синтез полноразмерных РНК [1, 4]. Поэтому основными продуктами «островков» являются короткие РНК длиной 14 нуклеотидов и меньше [2]. Это может быть следствием связывания нескольких молекул РНК-полимеразы с множественными промоторами «островков», что ограничивает способность сформированных комплексов переходить в стадию продуктивной элонгации. Подавление продуктивного синтеза может быть также обусловлено ингибиторами транскрипции, блокирующими РНК-полимеразу в стадии абортивной инициации. Таким ингибитором для «островков», в частности, является H-NS [2, 5]. В обоих этих случаях «островковые» РНК следует считать побочными продуктами транскрипционного «ареста».

Не исключено также, что «островковые» олигонуклеотиды, наоборот, являются продуктами эволюционно оптимизированного процессинга нужных клетке молекул. Это предположение возникло в результате обнаружения среди белков, взаимодействующих с «промоторными островками», РНКазы процессинга Rng и хеликазы RhlB [8]. Косвенно это свидетельствует о том, что «островковые» РНК подвергаются контролируемому посттранскрипционному созреванию. Поэтому целью данного исследования стал детальный анализ спектра белков, взаимодействующих с фракцией коротких РНК бактерий, а также оценка влияния ферментов процессинга на относительное количество «островковых» РНК в клетке.

## Эксперимент

На первом этапе был исследован спектр белков, способных связываться с фракцией малых РНК, среди которых присутствуют и РНК, синтезируемые с «промоторных островков». Для этого клетки кишечной палочки дикого типа *E. coli* K12 MG1655 были выращены при 37°C на среде LB до ранней стационарной фазы и осаждены центрифугированием при 10000 об/мин (+4°C). Фракция коротких РНК была получена с использованием набора mirVana™ (Ambion, США) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные РНК имели длину от 10 до 120 нуклеотидов. 3'-концы полученных РНК (50 пмоль) были модифицированы биотином с помощью набора Pierce RNA 3' Desthiobiotinylation kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя. Покрытые стрептавидином магнитные шарики Pierce Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads перед использованием были промыты двумя объемами буфера, содержащего 0.1 М NaOH и 50 мМ NaCl, а затем 100 мМ раствором NaCl. Затем на них были сорбированы удлиненные и биотинилированные РНК. Шарики дважды промывали равным объемом буфера, содержащего

20мМ Tris-HCl pH 7.5 и использовали для взаимодействия с белками клеточного лизата.

Для связывания был использован буфер следующего состава: 10 мМ HEPES-KOH (pH 9.0), 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF), 150 мМ KCl, 0.3% нонидет (NP-40) и 20% глицерин [8]. Клеточный лизат (1 см<sup>3</sup>) очищали от дебриса центрифугированием при 13400 об/мин в течение 10 мин (4°C), и 800 мкл супернатанта смешивали с иммобилизованной РНК. Комплексы формировали в течение 2 часов при 4°C и постоянном перемешивании. Затем лизат удаляли, а шарики дважды промывали 0.5 см<sup>3</sup> аналогичного буфера, но содержащего дополнительно 250 мМ KCl и 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Прочно сорбированные на фракцию малых РНК белки снимали с шариков свежеприготовленным раствором 100 мМ NaHCO<sub>3</sub>. Для этого пробы инкубировали на термостатируемом шейкере при 65°C и постоянном перемешивании 1000 об/мин в течение 3 часов. Затем все белки были подвержены трипсиновому гидролизу и идентифицированы с помощью хромато-масс-спектрометрии LC/MS (liquid chromatography–mass spectrometry) в CRG/UPF Proteomics Unit (Барселона, Испания). Контролем служили пробы с шариками, обработанными биотином и проинкубированные с лизатом клеток *E. coli*. Среди белков, прочно связавшихся с короткими РНК, оказалось много таких, которые тем или иным образом ассоциированы с транспортными РНК (таблица 1). Это ожидаемо, так как тРНК, имеющие размер от 73 до 93 нуклеотидов, закономерно входят в набор выделенных РНК. Обнаружены также все три основные субъединицы РНК-полимеразы ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\beta'$ ). Это тоже ожидаемо, так как канал выхода РНК из каталитического центра фермента формируется  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединицами [9], находящимися в комплексе с  $\alpha$ -субъединицами. Отсутствие  $\sigma$ -субъединиц, распознающих ДНК, а не с РНК, указывает на высокую специфичность метода.

Таблица 1. Наиболее интересные белки, взаимодействующие с фракцией коротких РНК *E. coli* K-12, по данным хромато-масс-спектрометрии. Курсивом выделены белки процессинга транспортных РНК. Жирным шрифтом - белки, способные связываться с короткими РНК «промоторных островков».

Название белка	Функция
Ffh	Сигнальный белок
CspD	Cold shock-like protein, связывается с одноцепочечной ДНК и РНК
ThiL	<i>тРНК сульфотрансфераза</i>
GlyS	<i>Бета-субъединица глицин-тРНК лигазы</i>
YfiF	<i>Неохарактеризованная тРНК/рРНК метилтрансфераза</i>
LysU	<i>Лизин-тРНК лигаза</i>
GlnS	<i>Глутамин-тРНК лигаза</i>
TruD	<i>тРНК псевдоуридин синтаза</i>
ThrS	<i>Треонин-тРНК лигаза</i>
AsnS	<i>Аспарагин-тРНК лигаза</i>
MnmG	<i>Фермент модификации уридина в тРНК</i>
TadA	<i>Специфическая к тРНК аденозин дезаминаза</i>
RhlB	АТФ-зависимая РНК-хеликаза
HrpA	АТФ-зависимая РНК-хеликаза
DeaD	DEAD-box белок А, РНК хеликаза.
PcnB	Poly(A) полимеразы I
Pnp	Полинуклеотид фосфорилаза (РНКазы Pnp)
Rne	Рибонуклеаза E
RpoC	$\beta'$ -субъединица РНК-полимеразы
RpoB	$\beta$ -субъединица РНК-полимеразы
RpoA	$\alpha$ -субъединица РНК-полимеразы

Особое значение имеет наличие в полученных препаратах трёх РНК-хеликаз, включая RhlB, уже обнаруженную нами ранее в комплексах с «островковыми» ДНК [8]. В клетках RhlB раскручивает двухспиральные РНК, помогая Pnp гидролизовать РНК [10]. Свойства HgrA пока мало исследованы [11], а DeaD дестабилизирует вторичные структуры мРНК в процессе трансляции [12], но также может облегчать образование дуплексов мРНК с регуляторными РНК [13]. Важно, что иммобилизованные на магнитных шариках короткие РНК сохраняют способность формировать вторичные структуры, являющиеся мишенями для хеликаз. Не удивительно поэтому, что среди обнаруженных белков оказалась РНКаза E, которая атакует однонитевые участки в петлях шпилечных структур. Образование таких петель в интересующих нас совсем коротких транскриптах казалось маловероятным, поэтому особое внимание мы обратили на полинуклеотид фосфорилазу Pnp.

Этот фермент является 3'-5' экзонуклеазой и, одновременно, 3'-концевой олигонуклеотид полимеразой. При высокой концентрации неорганического фосфата Pnp преимущественно работает как экзонуклеаза, но её активность зависит от состава и структуры 3'-конца [14]. Поэтому разные РНК гидролизуются Pnp с разной эффективностью. Особенностью РНКазы Rng является потребность в двухнитевом фрагменте РНК для связывания и в выступающем на 4-10 нуклеотидов 3'-конце для экзонуклеазной атаки [15]. Эта зависимость от структуры 3'-конца объясняет отсутствие Rng среди выявленных белков: 3'-конец использованных для сорбции РНК был биотинилирован и присоединён к магнитным шарикам. РНКаза Rng гидролизует рибосомные и другие РНК со шпилечными структурами, но не атакует однонитевые РНК [15] не содержащие двухнитевых фрагментов. Это значит, что её субстратами могут быть двухнитевые молекулы с выступающими 3'-концами, которые могут формироваться из двух транскриптов, независимо синтезированных со встречных промоторов «островков». Поэтому для ответа на вопрос, подвергаются ли «островковые» РНК посттранскрипционному процессингу, в дальнейшем мы исследовали зависимость внутриклеточного содержания четырёх «островковых» продуктов от наличия в клетках полинуклеотид фосфорилазы Pnp и РНКазы Rng.

Для этого среди олигонуклеотидов, зарегистрированных методом ChIP-seq в работе [16] были выбраны 5 модельных продуктов. Они синтезируются с «островков», находящихся в регуляторных областях (*arnB*, *focA* и *gadB*) или в кодирующих последовательностях (*ycdD* и *yjgL*) генов и имеют длины 14, 18, 23, 24 и 26 нуклеотидов, соответственно. Для регистрации таких коротких продуктов был использован разработанный ранее метод [17]. Суть его кратко изложена в подписи к рис. 1. В результате, были получены ампликоны 5 «островковых» олигонуклеотидов, фланкированные адаптерами с известной последовательностью, а количество соответствующих РНК в бактериальных клетках было определено в зависимости от присутствия в них Rng или Pnp (рис. 2).

В результате этой серии экспериментов мы установили, что «островковые» олигонуклеотиды, зарегистрированные в работе [16], действительно присутствуют в бактериальных клетках, причём количество трёх РНК зависит от обеих экзонуклеаз (Рис. 2А). Ни для одного из исследованных олигонуклеотидов мы не наблюдали уменьшения внутриклеточного содержания в делеционных мутантах. Это значит, что они продолжают оставаться субстратами экзонуклеаз и не являются конечными продуктами процессинга. На количество РНК, синтезируемой в гене *ycdD*, Pnp практически не влияла. Эта РНК (AATTCAGGACGCACTGTGGAGTG) может формировать шпильку длиной 6 н.п. (подчёркнуты комплементарные в РНК сегменты) со свободной энергией фолдинга -5.3 ккал/моль [18]. Такие РНК являются плохими субстратами для Pnp [15]. Остальные олигонуклеотиды стабильных вторичных структур не

формируют и подвергаются гидролизу обеими нуклеазами. Но для связывания с Rnp необходимо наличие двухнитевого сегмента. Это значит, что короткие РНК из геномных областей *arnB*, *yjgL* и *gadB* либо формируют комплементарные дуплексы с олигонуклеотидами, синтезируемыми со встречных промоторов, либо образуют шпилечные структуры с соседними участками более длинных РНК. Для этого антисмысловые продукты или длинные РНК, как минимум, должны присутствовать в бактериальных клетках. Их нет среди транскриптов, зарегистрированных в работе [16]. Однако высокая чувствительность обычного метода количественной ПЦР позволила зарегистрировать наличие в клетках длинных РНК для трёх геномных локусов (рис. 2Б). В молярном отношении их оказалось меньше, чем коротких РНК, синтезируемых из тех же областей.

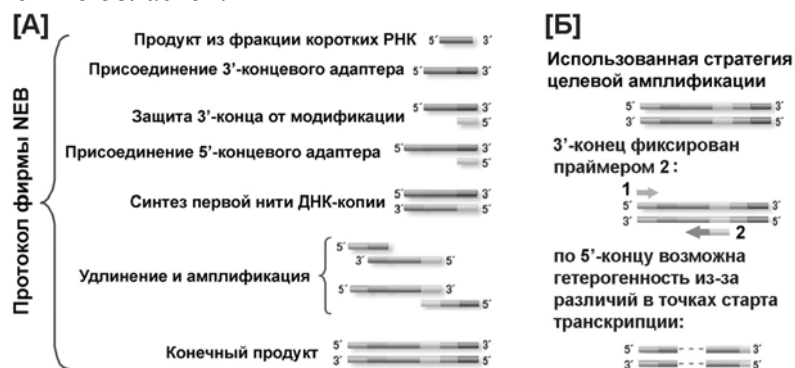


Рис. 1. Принцип индивидуальной детекции коротких РНК. А: Схема пробоподготовки коротких РНК фирмы NEB и предложенная нами дальнейшая стратегия целевой амплификации (Б) [17]. Сначала 3'- и 5'-концы всех полученных РНК были удлинены адаптерами с известной последовательностью (использованы T4-РНК-лигаза и набор реактивов NEBNext<sup>®</sup> Multiplex Small RNA Library Prep Set, New England Biolabs, США) (А). После получения ДНК-копий искомого РНК для ПЦР в реальном времени были использованы особые пары праймеров (рис. 1Б и табл. 2). В каждой из них один праймер соответствовал стыку между 5'-концом адаптера (выделен шрифтом в табл. 2), присоединённого к 3'-концу искомого олигонуклеотида, а встречный – 5'-концу противоположного адаптера (праймер 1 на рис. 1Б и в табл.2).

Любопытно, что количество мРНК гена *udcD* тоже не зависело от Rnp (рис. 2Б). Так как синтез кДНК возможен с любых РНК, содержащих последовательности обоих праймеров, пока не ясно, связано ли это с образованием вторичных структур на их 3'-концах, но ясно, что РНК гена *udcD* интенсивнее процессируется Rnp, чем её короткое производное. Более интенсивный процессинг обеими экзонуклеазами был также зарегистрирован для мРНК гена *arnB*, хотя для длинной РНК из гена *yjgL* зависимость от присутствия экзонуклеаз оказалась сопоставимой с короткой РНК. Анализ нуклеотидных последовательностей, прилегающих к целевым олигонуклеотидам из гена *yjgL* и из регуляторной области гена *arnB* программой RNAstructure [18] выявил их принципиальную способность к комплементарному спариванию. Часть олигонуклеотида *arnB* (выделен жирным шрифтом), например, может образовывать шпильку с соседней последовательностью (комплементарные участки подчеркнуты) с энергией фолдинга -3 ккал/моль:

**ACACAACCACTCTTTATAGCAAATATAAGTGGACAG.**

Стало ясно, что продуктивный синтез трёх «островковых» мРНК идёт в бактериальных клетках; образующиеся транскрипты подвергаются процессингу, а зависимость от Rnp для олигонуклеотидов, не формирующих вторичных структур, можно объяснить их комплементарным спариванием с соседними участками в РНК.

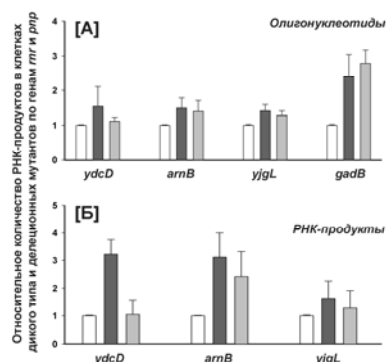


Рис. 2. Относительное количество «островковых» РНК, длиной ~14-26 н (А) и фрагментов мРНК длиной ~84-122 н (Б), обнаруженных в пробах, полученных из клеток дикого типа и двух мутантов. Используемые праймеры приведены в Таблице 2. Их конструкция для эксперимента, показанного на панели А, описана в подписи к Рис. 1. Для эксперимента Б праймеры для обратной транскрипции (R) были сдвинуты на расстояния 84-122 н.п. от 5'-конца исследованных олигонуклеотидов, а 5'-концы встречных праймеров (F), использованных для ПЦР соответствовали 5'-концу искомого продукта, но для обеспечения одинаковой температуры отжига в паре тоже были сдвинуты на 1-5 н.п. темно- (*rnr-*) и светло- (*pnp-*) серые столбики показывают средние значения отношения количества тестируемой РНК в клетках мутантов и дикого типа. Погрешности показывают среднее отклонение от среднего значения по трем биологическим и двум техническим повторностям. В качестве референсного продукта при тестировании коротких РНК (А) был использован олигонуклеотид, синтезируемый из регуляторной области гена *focA*, поскольку изменения в ответ на удаление *rnr* и *pnp* для него были минимальными. Референсным продуктом при тестировании длинных РНК была антисмысловая РНК из регуляторной области гена *ysaA*, уже использованная нами в работе [5]

Таблица 2. Используемые в работе праймеры:

Название	Последовательность (шрифтом выделена последовательность, соответствующая 5'-концу 3'-концевого адаптера)	Длина ампликона (н.п.)
Праймер 1	5'-AATGATACGGCGACCACC-3'	
Праймер 2/ <i>ydcD</i>	5'-TTCCGATCTTCACTCCACAG-3'	89
Праймер 2/ <i>arnB</i>	5'-CTTCCGATCTTAAAGAGTGTGTG-3'	80
Праймер 2/ <i>yjgL</i>	5'-CTCTTCCGATCTTGCTATACGTAAA-3'	94
Праймер 2/ <i>gadB</i>	5'-CTCTTCCGATCTTACTCCTTAAAATGA-3'	91
Праймер 2/ <i>focA</i>	5'-TTCCGATCTTAGTCGGCGAC-3'	83
Праймеры для амплификации длинных РНК		
F- <i>ydcD</i>	5'-CAGGACGCACTGTGGAGTGGTT-3'	122
R- <i>ydcD</i>	5'-CCCGTTGTTTTGTAGCGCAG-3'	
F- <i>arnB</i>	5'-ACACAACACTCTTT-3'	122
R- <i>arnB</i>	5'-TТАACTGCAGCGAGTTCCT-3'	
F- <i>yjgL</i>	5'-TCCACCGGAAAATTTACGTA-5'	84
R- <i>yjgL</i>	5'-CCCGGCATCACATTTATTTAT-3'	
F- <i>ysaA</i>	5'-ACGACCTCCATCGCACCAAACG-3'	207
R- <i>ysaA</i>	5'-GCAGTAGCCTGTCAATCAGTGTGAAGAT-3'	

## Обсуждение результатов

В работе использовано два экспериментальных подхода, направленных на выяснение причин накопления в клетках *E. coli* коротких олигонуклеотидов, синтезируемых с «промоторных островков». Обнаружение полинуклеотид фосфорилазы Pnp среди белков, специфически сорбированных на фракцию коротких РНК (табл. 1), и рибонуклеазы Rng в комплексе с фрагментами «промоторных островков» [8],

позволило высказать предположение, что короткие РНК «островков» являются результатом посттранскрипционного процессинга. Такой процессинг может быть направлен на удаление ненужных клетке РНК, потому что «островки», как правило, ассоциированы с генами, полученными *E. coli* в результате случайного переноса. В таком случае интенсивнее должна работать нуклеаза Rnr, которая может гидролизовать многие РНК. Если же «островковые» олигонуклеотиды нужны клетке, то более длинные транскрипты должны подвергаться процессингу специальными нуклеазами. Такой нуклеазой, в частности, является Rnr, которая участвует в «созревании» рРНК и тРНК, распознавая в них двухспиральные структуры и выступающий 3'-конец. Практически во всех случаях мы обнаружили большую зависимость внутриклеточного содержания исследованных РНК от наличия в клетках Rnr, что соответствует предположению об их целенаправленном процессинге. Однако вопрос о биологической целесообразности избыточных промоторов остается открытым. Кроме «промоторных островков» такие «лишние» промоторы обнаружены внутри генов, а вблизи функциональных промоторов очень часто находятся дополнительные сайты для связывания РНК-полимеразы. Неконтролируемая транскрипция с таких промоторов может быть вредна для бактериальной клетки из-за нарушения баланса в транскрипционном и трансляционном аппаратах или из-за формирования ДНК:РНК-гибридов, нарушающих целостность генома [19]. Поэтому «незаконная» транскрипция должна быть подавлена, и в этот процесс может быть вовлечено несколько механизмов. Одним из них является ингибирование транскрипции гистоноподобным белком H-NS [20]. Это один из мажорных белков в экспоненциально растущих клетках. Он может подавлять синтез РНК, вытесняя РНК-полимеразу с промоторов или предотвращать инициацию за счет образования петель ДНК [21]. Его особенностью является способность специфически подавлять экспрессию чужеродных генов, в том числе благодаря связыванию с «промоторными островками» [5]. То есть, низкая продуктивность «островков» может быть следствием адаптивной супрессии потенциально опасных для клетки генов. Не исключено, что определённую роль в этом процессе играют их собственные короткие олигонуклеотиды.

## Заключение

РНК-продукты «промоторных» островков являются субстратами для РНКаз Rnr и Rnr. Зависимость их внутриклеточного содержания от нуклеазы специфического процессинга Rnr в большинстве исследованных случаев оказалась выше, чем от наличия в клетках полинуклеотид фосфорилазы Rnr. Указывая на биологическую значимость посттранскрипционного процессинга «островковых» транскриптов, это предполагает их участие в выполнении каких-то функций, природу которых ещё только предстоит понять.

*Эксперимент с сорбцией на ДНК сделан при поддержке РФФ (грант № 14-14-00985, выполняемый всеми авторами). Влияние Rnr и Rnr на количество «островковых» продуктов исследовано при совместной поддержке РФФИ и правительства Московской области (грант № 14-44-03601 p\_центр\_a).*

## Список литературы

1. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N., Deev A.A., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. No 15. pp. 4919-4931. DOI: 10.1093/nar/gkp490.

2. Panyukov V.V., Ozoline O.N. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. No 5. e62601. DOI: 10.1371/journal.pone.0062601.
3. Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Masulis I.S., Ozoline O.N. // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2011. Vol. 28. No 6. pp. 1128-1129. Available at: [www.jbsdonline.com/promoter-islands-novel-elements-bacterial-genomes-p18060.html](http://www.jbsdonline.com/promoter-islands-novel-elements-bacterial-genomes-p18060.html)
4. Панюков В.В., Киселев С.С., Шавкунов К.С., Масулис И.С. и др. // *Математ. Биол. Биоинф.* 2013. Т. 8. № 2. С.432-448. DOI: 10.17537/2013.8.432.
5. Purtov Yu.A., Glazunova O.A., Antipov S.S., Pokusaeva V.O. et al. // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2014. Vol. 12. No 2. pp. 1441006-1441017. DOI: 10.1142/S0219720014410066.
6. Oshima T., Ishikawa S., Kurokawa K., Aiba H. et al. // *DNA Res.* 2006. Vol. 13. No 4. pp. 141-153. DOI: DOI: 10.1093/dnares/ds1009.
7. Lucchini S., Rowley G., Goldberg M. D., Hurd D. et al. // *PLoS Pathog.* 2006. Vol. 2. No 8. e81. DOI: [org/10.1371/journal.ppat.0020081](http://org/10.1371/journal.ppat.0020081).
8. Швырева У.С., Тутукина М.Н., Озолин О.Н. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2015. Т. 15. № 4. С. 586-594. [www.sorpchrom.vsu.ru/articles/20150415.pdf](http://www.sorpchrom.vsu.ru/articles/20150415.pdf).
9. Geszvain K., Landick R. The Structure of Bacterial RNA Polymerase. In Higgins N (ed), *The Bacterial Chromosome*. ASM Press, Washington, DC. 2005. pp 283-296. doi: 10.1128/9781555817640.ch15
10. Coburn G.A., Miao X., Briant D.J., Mackie G.A. // *Genes Dev.* 1999. Vol. 13. pp. 2594-2603. DOI: 10.1101/gad.13.19.2594.
11. Gama-Castro S., Salgado H., Santos-Zavaleta A. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2016. Vol. 44. No D1. pp. D133-D143. DOI: 10.1093/nar/gkv1156.
12. Kitahara K., Suzuki T. // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 34. pp. 760-766. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.05.014.
13. Vakulskas C.A., Pannuri A., Cortes-Selva D., Zere T.R. et al. // *Mol. Microbiol.* 2014. Vol. 92. No 5. pp. 945-958. DOI: 10.1111/mmi.12606.
14. Plamann M.D., Stauffer G.V. // *Gene.* 1990. Vol. 220. No 2. pp. 301-306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691434>. Accessed 30.06.2016.
15. Vincent H.A., Deutcher M.P. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. No 40. pp. 29769-29775. DOI: 10.1074/jbc.M606744200
16. Dornenburg J.E., Devita A.M., Palumbo M.J., Wade J.T. // *Mbio.* 2010. e00024-10. DOI: 10.1128/mBio.00024-10.
17. Глазунова О.А., Киселев С.С., Шавкунов К.С., Быков А.А. и др. // *Математ. Биол. Биоинф.* 2014. Т. 9. № 2. С. 563-564. DOI: 10.17537/2014.9.563.
18. Reuter J.S., Mathews D.H. // *BMC Bioinform.* 2010. Vol. 11. pp. 129. DOI: 10.1186/1471-2105-11-129.
19. Gowrishankar J., Harinarayanan R. // *Mol. Microbiol.* 2004. Vol. 54. No 3. pp. 598-603. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04289.
20. Singh S.S., Singh N., Bonocora R.P., Fitzgerald D.M. et al. // *Grainger D.C., Genes Dev.* 2014. Vol. 28. No 3. pp. 214-219. DOI: 10.1101/gad.234336.113.
21. Dame R.T., Wyman C., Wurm R., Wagner R. et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. No 3. pp. 2146-2150. DOI: 10.1074/jbc.C100603200.

## References

1. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N., Deev A.A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 2009, Vol. 37, No 15, pp. 4919-4931. DOI: 10.1093/nar/gkp490.
2. Panyukov V.V., Ozoline O.N., *PLoS One*, 2013, Vol. 8, No 5, e62601. DOI: 10.1371/journal.pone.0062601.
3. Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Masulis I.S., Ozoline O.N., *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2011, Vol. 28, No 6, pp. 1128-1129. Available at: [www.jbsdonline.com/promoter-islands-novel-elements-bacterial-genomes-p18060.html](http://www.jbsdonline.com/promoter-islands-novel-elements-bacterial-genomes-p18060.html)
4. Panyukov V.V., Kiselev S.S., Shavkunov K.S., Masulis I.S., Ozoline O.N., *Math. Biol. Bioinform.*, 2013, Vol. 8, No 2, pp. t12-t26. DOI: 10.17537/2013.8.t12.
5. Purtov Yu.A., Glazunova O.A., Antipov S.S., Pokusaeva V.O. et al., *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2014, Vol. 12, No 2, pp. 1441006-1441017. DOI: 10.1142/S0219720014410066.
6. Oshima T., Ishikawa S., Kurokawa K., Aiba H. et al., *DNA Res.*, 2006, Vol. 13, No 4, pp. 141-153. DOI: DOI: 10.1093/dnares/ds1009.
7. Lucchini S., Rowley G., Goldberg M. D., Hurd D. et al., *PLoS Pathog.*, 2006, Vol. 2, No 8, e81. DOI: [org/10.1371/journal.ppat.0020081](http://org/10.1371/journal.ppat.0020081).



8. Shvyreva U.S., Tutukina M.N., Ozoline O.N., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2015, Vol. 15, No 3, pp. 435-442. [www.sorphrom.vsu.ru/articles/20150313.pdf](http://www.sorphrom.vsu.ru/articles/20150313.pdf).
9. Geszvain K., Landick R., The Structure of Bacterial RNA Polymerase. In Higgins N (ed), *The Bacterial Chromosome*. ASM Press, Washington, DC, 2005, p 283-296. doi: 10.1128/9781555817640.ch15
10. Coburn G.A., Miao X., Briant D.J., Mackie G.A., *Genes Dev.*, 1999, Vol. 13, pp. 2594-2603. DOI: 10.1101/gad.13.19.2594.
11. Gama-Castro S., Salgado H., Santos-Zavaleta A. et al., *Nucl. Acids Res.*, 2016, Vol. 44, No D1. pp. D133-D143. DOI: 10.1093/nar/gkv1156.
12. Kitahara K., Suzuki T., *Mol. Cell.*, 2009, Vol. 34, pp. 760-766. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.05.014.
13. Vakulskas C.A., Pannuri A., Cortes-Selva D., Zere T.R. et al., *Mol. Microbiol.*, 2014, Vol. 92, No 5, pp. 945-958. DOI: 10.1111/mmi.12606.
14. Plamann M.D., Stauffer G.V., *Gene*, 1990, Vol. 220, No 2, pp. 301-306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691434>. Accessed 30.06.2016.
15. Vincent H.A., Deutcher M.P., *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, No 40, pp. 29769-29775. DOI: 10.1074/jbc.M606744200
16. Dornenburg J.E., Devita A.M., Palumbo M.J., Wade J.T., *Mbio*, 2010, e00024-10. DOI: 10.1128/mBio.00024-10.
17. Glazunova O.A., Kiselev S.S., Shavkunov K.S., Bykov A.A., et al., *Math. Biol. Bioinform.*, 2015, Vol. 10, pp. t29-t38. DOI: 10/17537/2015.10.t29.
18. Reuter J.S., Mathews D.H., *BMC Bioinform.*, 2010, Vol. 11, pp. 129. DOI: 10.1186/1471-2105-11-129.
19. Gowrishankar J., Harinarayanan R., *Mol. Microbiol.*, 2004, Vol. 54, No 3, pp. 598-603. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04289.
20. Singh S.S., Singh N., Bonocora R.P., Fitzgerald D.M. et al., *Grainger D.C., Genes Dev.*, 2014, Vol. 28, No 3, pp. 214-219. DOI: 10.1101/gad.234336.113.
21. Dame R.T., Wyman C., Wurm R., Wagner R. et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, No 3, pp. 2146-2150. DOI: 10.1074/jbc.C100603200.

**Тутукина Мария Николаевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область г.ушино

**Пуртов Юрий Александрович** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область Пушкино

**Швырева Ульяна Сергеевна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино

**Быков Александр Андреевич** – старший лаборант лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино, тел.: (4967) 739-140

**Шавкунов Константин Сергеевич** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область Пушкино, тел.: (4967) 739-140

**Глазунова Ольга Андреевна** – аспирант лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино, тел.: (4967) 739-140

**Озолин Ольга Николаевна** – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино

**Tutukina Maria N.** - PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [masha306@gmail.com](mailto:masha306@gmail.com)

**Purtov Yury A.** PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [vinnegan@rambler.ru](mailto:vinnegan@rambler.ru)

**Shvyreva Uliana S.** - PhD in Molecular biology, research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [uliana.shvyreva@gmail.com](mailto:uliana.shvyreva@gmail.com)

**Bykov Alexander A.** - senior technician in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [for-rozinho\\_cap@mail.ru](mailto:for-rozinho_cap@mail.ru)

**Shavkunov Konstantin S.** - PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [shavkunovks@gmail.com](mailto:shavkunovks@gmail.com)

**Glazunova Olga A.** - PhD student in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [total\\_green@mail.ru](mailto:total_green@mail.ru)

**Ozoline Olga N.** - Dr.Sci., professor, Head of the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [ozoline@rambler.ru](mailto:ozoline@rambler.ru)