



УДК 577.112.083

«Промоторные островки» генома *E. coli* как мишени для сорбции ферментов процессинга РНК

Швырева У.С., Тутукина М.Н., Озолин О.Н.

ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пущино

Поступила в редакцию 08.05.2015 г.

Фрагменты ДНК, взятые из обогащенных промоторами участков генома *E. coli* («промоторных островков»), были иммобилизованы на покрытых стрептавидином магнитных шариках и использованы для сорбции белков клеточного лизата (pull-down assays). В результате масс-спектрометрического анализа фракции белков, способных взаимодействовать с такими фрагментами ДНК, было идентифицировано, по крайней мере, два белка процессинга РНК (экзорибонуклеаза Rnr и РНК-хеликаза SrmB), а также РНК-хеликаза деградосомы (RhlB). Это свидетельствует о том, что «Промоторные островки» могут служить источником функционально значимых РНК, подвергающихся контролируемому пост-транскрипционному процессингу.

Ключевые слова: *E. coli*, промоторные островки, pull-down assays.

«Promoter islands» of the *E. coli* genome as targets for sorption of the RNA processing enzymes

Shvyreva U.S., Tutukina M.N., Ozoline O.N.

Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Science, Pushchino

In this work, a comparative analysis of proteins capable of interaction with the DNA fragments taken from the promoter-enriched genomic regions of *E. coli* («promoter islands») and two regulatory regions located upstream the *dps*, *yjiM* (*IgoR*) and *yjiN* (*IgoD*) genes was undertaken. Corresponding DNA fragments were immobilised on streptavidin-coated magnetic beads and used for sorption of proteins from cell lysate. After removal of the unbound polypeptides, proteins were eluted and used for electrophoretic fractionation. As expected, several polypeptides showed specific affinity to each of studied promoter regions, reflecting the features of their regulation. Surprisingly, two proteins with RNA processing potentiality (RNase Rnr and RNA-helicase SrmB) and the component of degradosome (RNA-helicase RhlB) were also indentified in the complexes with «promoter islands». The protein with electrophoretic mobility corresponding to Rnr was also found in the other samples but with lower abundance. Suggesting the possibility of continuous presence of processive RNase on the genome, this fact is also indicative of its enhanced affinity to the promoter-enriched regions that can be mediated by the availability of key substrates for this enzyme.

Keywords: *E. coli*, promoter islands, pull-down assays.

Введение

Сравнительно недавно в геноме *Escherichia coli* с использованием алгоритма поиска промоторов PlatProm были обнаружены участки, обогащенные потенциальными промоторами, они получили название «промоторных островков» [1-5]. Анализ их распределения в геноме показал, что во многих случаях они ассоциированы с генами, полученными кишечной палочкой в результате

горизонтального переноса [6, 7]. Поэтому исследование особенностей организации и функционирования «островков» приобрело особое значение для понимания механизмов эволюции прокариотических геномов.

Первые эксперименты, проведенные *in vitro*, показали, что «промоторные островки» эффективно связывают РНК-полимеразу (РНКП) и способны формировать с ней «открытые комплексы», необходимые для инициации транскрипции [1, 4]. Однако, вопреки ожиданиям, в экспериментах *in vivo* для большинства «островков» не удалось обнаружить полноразмерных РНК продуктов, а лишь короткие олигонуклеотиды длиной 9-20 п.о. [2]. Так как «промоторные островки» содержат множественные старты транскрипции на обеих нитях ДНК, связывание РНКП с несколькими такими сайтами одновременно может создавать препятствия для продуктивного синтеза РНК. Кроме этого, было установлено, что синтез «островковых» РНК ингибируется гистон-подобным белком нуклеоида H-NS [5]. То есть, низкая продуктивность «островков» может быть следствием адаптивной супрессии потенциально опасных для клетки генов. Однако делеция гена другого белка нуклеоида - Dps, который преобладает на стационарной фазе роста или в стрессовых условиях, не оказывая влияния на транскрипционную активность одних «островков», подавляла активность других [5]. Это предполагает подверженность «островков» не только ингибированию, но и активации. Их продукты, следовательно, могут быть востребованы бактериями. Компьютерный поиск обнаружил в «островках» модули для взаимодействия с целым рядом других факторов транскрипции, причем для шести регуляторных белков (ArcA, Fur, Nac, NhaR, OxyR и YhiX/GadX) частота их присутствия оказалась выше, чем в последовательностях обычных промоторов [5].

На основании этих данных было сформулировано три модели возможной биологической роли «островков». 1) «Островки» являются продуктом адаптивной эволюции, направленной на супрессию чужеродных генов; 2) они являются «фабриками» для синтеза коротких олигонуклеотидов, играющих регуляторную роль, аналогичную tssRNA (tssRNA (transcription start site associated) эукариот [8-10]; 3) «островки» могут быть просто платформами для удерживания РНКП и регуляторных белков в готовом для быстрого использования состоянии. Задачей данного исследования было получить информацию о спектре белков, способных взаимодействовать с «островковыми» ДНК, иммобилизованными на покрытых стрептавидином магнитных шариках (pull-down assay). Если верно первое предположение, то основным партнёром «островков», кроме РНКП, должен быть H-NS (и, возможно, его паралог StrA), который специфически подавляет экспрессию «чужих» генов [7]. Во втором случае мы надеялись обнаружить факторы транскрипции, РНК-шапероны и белки процессинга РНК, количество которых могло зависеть от фазы роста, а в третьем – структурные белки нуклеоида и факторы транскрипции. Чтобы уменьшить вклад индивидуальных особенностей «островков» и выявить общую закономерность в их сорбционных свойствах, для эксперимента была использована эквимольная смесь 23 фрагментов ДНК, амплифицированных с 21 из 78, обнаруженных в геноме *E. coli*, «островков».

Эксперимент

В качестве мишеней для связывания белков клеточного лизата были использованы такие фрагменты генома кишечной палочки, в которых по имеющимся данным формировались транскрипционно-компетентные комплексы [2,

3]. Для проверки специфичности связывания белков были выбраны два контрольных фрагмента из регуляторных областей, расположенных перед геном *dps* и между двумя дивергентными генами *yjjM* (*lgoR*) и *yjjN* (*lgoD*), кодирующими фактор транскрипции и фермент катаболизма галактоната. Промоторы гена *dps* инициируют синтез как длинных, так и коротких РНК, промотор *yjjN* транскрипционно мало активен, а основными продуктами *yjjM* являются длинные РНК. Тестируемые фрагменты были амплифицированы в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, приведёнными в табл. 1, и очищены после фракционирования в акриламидных гелях, как описано в [11].

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации тестируемых фрагментов ДНК

Название гена	Праймеры		Размер
<i>appY/ompT</i>	TTATTA CTG GAC ACTTACGTT	TTTCAGTAAATCCGATCTCT	380
<i>ymfD/ymfE</i>	ATTATATTGAACTCTTCTGG	AATGCTTCTAATATACTCG	392
<i>ydeO/yneN</i>	TTATTA CTG GAC ACTTACGTT	TTTCAGTAAATCCGATCTCT	360
<i>yeaI</i>	AACTAAATAGATAAGGCCA CT	ААТААААТССАГСАСТСАСА	310
<i>wbbK</i>	CATTGGATTTGTCTGCAT	TCGTAATTTTTAAATACTCG	380
<i>yfdE/vacJ</i>	TGTTATCCCTCAATTACCAC	TGCAAAATATAAATGCGAC	340
<i>yfdI_1</i>	GCAGTAGATATTATTAGCA AC	TACGTCCTGTTTATTAGCAT	375
<i>yfdI_2</i>	ATTCCAAATAAATGCTTGC T	CACCATCTTCAAACCTCC	420
<i>ygcE/ygcF</i>	CAACATATCCACGTAACAC	TGTA AAACCACTCATTAGCC	272
<i>yhaC</i>	CAGAATACATATCGCTAAT G	AAAACCAGGAAATATCCACAG	342
<i>yhhZ</i>	CTTTGCTGTTTAAACGTTT	ATATTAATAATACGGGGCTT	393
<i>yrhA</i>	CCCCGATCACTAACCGTTC	CTGGCTCAATTTATCCTCCC	401
<i>yhiL</i>	GTA AATGATCGTAGTCACC	TTTCCTTAGTAAACGTCTCTT	343
<i>rfaC/rfaL</i>	ACTATGGTAAGTAGCACGA A	ATTAACCTCAACAGTCAAGC	372
<i>waaU/rfaZ</i>	AATATAGAACTTCAACCGA T	GGTTGATTCTTTAATACAG	364
<i>rfaY/rfaJ</i>	TCTGATCCTGAATTACTTG G	CACGGTTTAGTTGCACCTGT	308
<i>rfaB/rfaS</i>	CGTATTA AAGAGCGAACAC A	CCAACAGTATTTCTTAGAAG	377
<i>yigF/yigG</i>	TAAGATTTCCAGACGTCGT TA	TCACTTAATGAACCATCGT	400
<i>arpA</i>	TCCACGTCCGTCTTACAAG C	GGAAACCAACGCCAAAGTCT	390
<i>yjbI_1</i>	TCCATCAGAAAATTGCAAG	CAGAGATTCTTTTCCTTTCG	375
<i>yjbI_2</i>	AGATGCCAAACATTTGCTT	GAATGAAGATCTCGATGGTT	416
<i>tyrB/yjbS</i>	AGTTAACA AAAATCAGGGGT A	ATTTCTGCACATCTAACCA	310
<i>yjgL</i>	CCAATTAATCATCTCAGGA TA	TAATGATGTAAGAATACTGG	376
<i>dps</i>	TCCTCTAGATGTTAT GTCCAGT	AAGATCTTCCTCGGAGA AACACT	422
<i>yjjM/yjjN</i>	CGCCGGATCCTCAATGACC TGGTTA	GGCATGAATTCCGGTACCGCAA TCC	500

С использованием набора для 3'-концевого мечения специфических зондов и соответствующего протокола фирмы изготовителя (Sileks, Москва) к фрагментам контрольных промоторов и эквимольной смеси фрагментов «промоторных островков» был присоединён биотин. Восемьдесят пикомоль полученных препаратов были иммобилизованы на покрытые стрептавидином магнитные шарики (New England Biolabs, США) и использованы для сорбции растворимых белков клеточного лизата.

Клетки *E. coli* K12 MG1655 растили в 5 мл среды Лурия-Бертани до середины экспоненциальной фазы или до стационарного роста, собирали центрифугированием и разрушали ультразвуком на льду в течение 60 секунд в 1 мл буфера, содержащего 10 mM HEPES-KOH (pH 9.0), 0.25 mM ЭДТА, 1 mM фенолметилсульфонилфторида (PMSF), 150 mM KCl, 0,3% нонидета (NP-40) и 20% глицерина. Клеточный лизат центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин, и 800 мкл супернатанта смешивали с иммобилизованной ДНК. Комплексы формировали 8 часов при 4°C. Затем супернатант удаляли, а шарики промывали дважды 0.5 мл того же буфера, но содержащего 250 mM KCl и 1.5 mM MgCl₂. Связавшиеся белки экстрагировали буфером, содержащим 0.1 M Трис-HCl (pH 6.8), 10% 2-меркаптоэтанол, 4% додецилсульфата натрия (SDS), 0,008% бромфенолового синего и 20% глицерина. Затем их фракционировали электрофоретически в 15% полиакриламидном геле с использованием трицинового буфера как описано в [12]. Белковые полосы окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250 и AgNO₃, а сами белки идентифицировали масс-спектрометрически.

Результат фракционирования белков, полученных из клеток, остановленных во время быстрого роста, и связавшихся с тестируемыми фрагментами ДНК, показан на рис. 1.

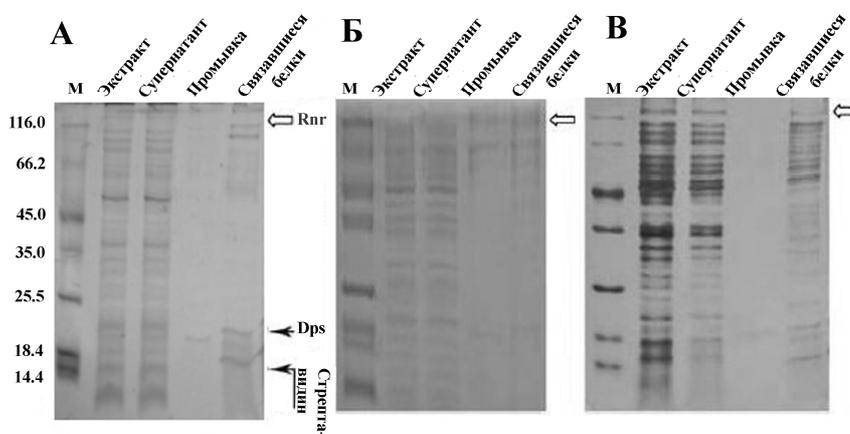


Рис. 1. Электрофореграммы «связавшихся белков», полученных из «экстракта» клеток (вторая дорожка), остановленных во время экспоненциального роста и взаимодействующих с «промоторными островками» (А), промотором гена *dps* (Б) и промоторной областью дивергентных генов *ujjM* и *ujjN*. М – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, США).

«Супернатант» - фракция не сорбировавшихся белков; «промывка» - фракция белков, смытых с шариков буфером с 250 mM KCl. Место миграции экзорибонуклеазы Rnr и других идентифицированных белков показано стрелками. Для визуализации полос гель окрашивали нитратом серебра (А и В) или Кумасси бриллиантовым синим R-250 (Б).

Как и ожидалось, профили белков, сорбированных на разные фрагменты ДНК, оказались различными, что свидетельствует о специфичности метода. В комплексе с «островковыми» ДНК было обнаружено повышенное содержание низкомолекулярных белков (рис. 1А). Именно такими белками является

большинство факторов транскрипции (H-NS – 15.5 кДа, Fur – 16.8 кДа, ArcA – 27.3 кДа, YhiX/GadX – 31.6 кДа, Nac – 32.8 кДа, NhaR – 34.3 кДа, OxyR – 34.3 кДа). Однако в диапазоне молекулярных масс (Mw) 25-12 кДа нам удалось идентифицировать только белок бактериального нуклеоида Dps (Mw=18.9 кДа), и фрагменты смытого с шариков стрептавидина (Mw=60 кДа). Белка H-NS среди них обнаружено не было, хотя его способность взаимодействовать с «островковыми» ДНК не вызывает никаких сомнений [2, 4, 13]. Этот неожиданный негативный результат, по-видимому, объясняется ограниченной способностью метода идентифицировать белки с низкой молекулярной массой в гетерогенных смесях. Присутствие в элюатах Dps может быть обусловлено не только его неспецифическим сродством к ДНК [14], но и сорбцией белка непосредственно на магнитных шариках из-за наличия в его полости ферритового ядра с собственным магнитным моментом [15]. Среди белков, мигрирующих в диапазоне 15-45 кДа, были также идентифицированы рибосомные белки, которые часто загрязняют образцы просто из-за их высокой концентрации в клетках, а также терминальная трансфераза (Mw=44 кДа), использованная для биотинилирования фрагментов ДНК. Таким образом, полученные данные подтвердили специфичность метода, но не противоречили ни одной из сформулированных моделей о биологической функции «островков». Поэтому на следующем этапе аналогичный эксперимент был выполнен для экстрактов клеток, выращенных до стационарной фазы. Такое изменение условий не могло не повлиять на профиль связывания факторов транскрипции, особенно, если «промоторные островки» выполняют регуляторную функцию.

Результаты такого эксперимента для «островковых» ДНК представлены на рис. 2. Как и ожидалось, доля низкомолекулярных белков в исследованных образцах уменьшилась. Косвенно это свидетельствует против предположения о том, что «островки» являются просто платформами для сорбции «свободных» факторов транскрипции в клетке, так как на стационарной фазе таких белков не меньше, чем во время быстрого роста. Среди собранных белков, по-прежнему, не было H-NS, но это вполне ожидаемо, так как при переходе от экспоненциального к стационарному росту число его молекул в клетках уменьшается с 20000 до 8000. Доминирующим белком нуклеоида при этом становится Dps, а число его молекул увеличивается с 6-14000 до 180000 [16]. Этот белок был обнаружен во всех образцах, соответствующих Mw 18-20 кДа. Не исключено, что такая диффузность свидетельствует о структурной гетерогенности Dps, его частичной дегградации [14] или способности связываться с низкомолекулярными лигандами РНКовой природы [17]. Как и ожидалось, в условиях заторможенного роста фракция белков, связавшихся с «островковыми» ДНК, содержала гораздо меньше рибосомных белков, чем в предыдущем случае, хотя в ней, по-прежнему, присутствовала ассоциированная с рибосомами фосфотидилсерин синтетаза PssA.

Самым важным результатом этой серии экспериментов оказалось обнаружение в комплексе с «промоторными островками»: РНКазы Rng, осуществляющей процессинг, а не дегградацию РНК и двух хеликаз RhlB и SrmB. Белок по электрофоретической подвижности соответствующий Rng был обнаружен и в других образцах, но в меньшем количестве. Указывая на возможность постоянного присутствия процессивной РНКазы на геноме, это также свидетельствует о ее повышенном сродстве к обогащенным промоторами участкам, которое может быть опосредовано наличием в этих участках целевых субстратов этого фермента – двуцепочечных РНК. В любом случае, обнаружение ферментов процессинга РНК во фракции собранных белков свидетельствует о продуктивности «островков», то есть

соответствует предположению, что короткие РНК могут быть целевыми продуктами этих участков генома.

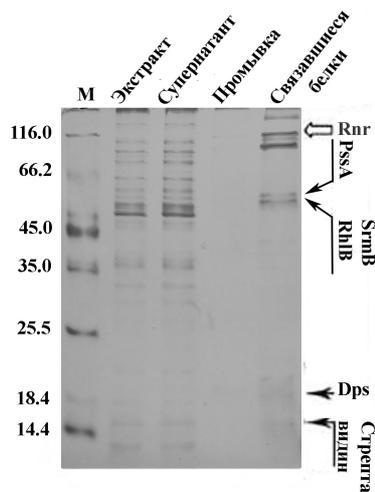


Рис. 2. Электрофореграммы белков, связавшихся с «промоторными островками» и полученными из «экстракта» клеток, собранных во время стационарного роста.

Все обозначения указаны в подписи к рис. 1. Для визуализации полос гель окрашивали нитратом серебра.

Обсуждение результатов

При анализе фракции белков, полученных в результате специфической сорбции на разные ДНК-фрагменты, нам не удалось обнаружить ожидаемого белка нуклеоида, H-NS. Это может быть связано с низким разрешением акриламидных гелей, оптимальных для разделения белков с молекулярной массой больше 20 кДа. Однако нами не были идентифицированы и подходящие по размеру белки регуляторы, имеющие консенсусные последовательности в большинстве «промоторных островков». Скорее всего, это обусловлено их низкой концентрацией в бактериальных клетках, которая до широкого введения в лабораторную практику методов молекулярного клонирования и суперпродукции существенно тормозило исследование факторов транскрипции. Ещё одной причиной малой представленности регуляторных белков в исследованных образцах может быть их закономерное удаление из экстракта вместе с геномной ДНК, содержащей все сайты специфического связывания каждого из них.

Тем удивительнее оказалось обнаружение белков процессинга РНК в комплексе с ДНК, ведь число их РНК-мишеней в бактериальных лизатах очень велико, и для связывания с иммобилизованными ДНК, полученными *in vitro*, необходима диссоциация уже существующих комплексов или формирование тройных ДНК-РНК-белковых комплексов. Две РНК-хеликазы RhlB ($M_w=47.1$ кДа) и SrmB ($M_w=49.9$ кДа) были обнаружены в виде смеси. RhlB является АТФ-зависимой хеликазой, способствующей деградации структурированных РНК. То есть, её повышенное содержание в комплексах с «островковыми» ДНК может снижать число полноразмерных РНК-продуктов, предоставляя ещё одно объяснение их низкой продуктивности. Хеликаза SrmB выполняет более сложные функции в бактериальной клетке. Она, в частности, принимает участие в сборке 50S субъединицы рибосомы [18], взаимодействует с рядом рибосомных белков и полиА-полимеразой, а также может стабилизировать некоторые РНК [19]. Эта последняя

функция наименее понятна, но может иметь значение для дальнейшего понимания биологической роли «островковых» РНК.

В образце, соответствующем экзонуклеазе Rng, был обнаружен только этот белок. Так как Rng не является доминирующим белком в клеточном лизате (см. дорожки «экстракт» и «супернатант» на всех гелях), её появление во фракции связавшихся белков нельзя считать случайным. Пока нет оснований думать, что Rng может специфически связываться с какими-то особыми структурными модулями непосредственно в ДНК. Скорее всего, это повышенное сродство обусловлено её взаимодействием с собственными РНК-мишенями, по каким-то причинам присутствующими в комплексах с иммобилизованными ДНК. Не исключено, что это присутствие опосредовано белками, адсорбирующими РНК и формирующими прочные комплексы с промоторами. Таким белком, например, может быть Dps, так как электростатическая природа его взаимодействия с ДНК [17] предполагает способность связываться и с РНК. Более вероятной кажется возможность синтеза олигонуклеотидов во время сорбции и пробоподготовки, т.к. в лизатах имеется РНК-полимераза и все субстраты. Важно, что экзорибонуклеаза Rng не связывается с одностранными РНК. Её субстратами являются выступающие на 4-10 оснований 3'-концы двухнитевых РНК [20, 21], и встречные промоторы «островков» вполне могут обеспечить синтез двух коротких комплементарных РНК, формирующих дуплекс с выступающими 3'-концами. Это объясняет повышенное содержание Rng в образцах, полученных с «островковых» РНК, по сравнению с фракциями белков, элюированных с обычных промоторов.

В любом случае, обнаружение РНКазы процессинга, а не деградации РНК среди белков, связывающихся с фрагментами «промоторных островков», свидетельствует о том, что их продукты транскрипции могут подвергаться пост-транскрипционному процессингу. А это значит, что сами промоторные островки могут служить источником функционально значимых РНК в бактериальных клетках. Так как каталитический центр Rng находится внутри «туннеля», вмещающего 4 нуклеотида, конечными одностранными продуктами преимущественно являются тринуклеотиды, которые могут участвовать в праймировании транскрипции с некоторых промоторов. Давно известно, что РНКП могут начинать синтез РНК, используя 2-8 нуклеотидные затравки [22, 23], а недавно было установлено, что у *Pseudomonas aeruginosa* со сниженным содержанием олигорибонуклеазы накапливаются «наноРНК» длиной 2-4 нуклеотида, и это изменяет профиль генной экспрессии [24]. Но так как для взаимодействия с процессируемой РНК необходим двухнитевой участок, при их гидролизе с обоих концов вполне могут образоваться калиброванные по размеру РНК дуплексы, имеющие выступающие 3'-концы. Такие молекулы очень похожие на интерферирующие микроРНК эукариот, которые имеют стандартную длину (21-23 п.о.), в большинстве случаев синтезируются со специальных генов и процессируются специальными РНКазами Dicer и Drosha [25]. Вопрос о том, являются ли «островки» «генами» или специальными участками для синтеза бактериальных микроРНК пока остаётся открытым, но результаты данной работы свидетельствуют о целесообразности детального исследования такой возможности.

*Исследования были поддержаны грантами РФФ № 14-14-00985,
РФФИ: №13-04-00997, №15-04-08716 и № 14-44-03601(р_центр_a).*

Список литературы

1. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. pp. 4919-4931.
2. Panyukov V.V., Ozoline O.N. // *PLoS One*, 2013, Vol. 8(5), pp.e62601.
3. Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Masulis I.S. et al. // *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2011, Vol. 28, pp. 1128-1129.
4. Panyukov V.V., Kiselev S.S., Shavkunov K.S. et al. // *Math. Biol. Bioinform.*, 2013, Vol. 8(2), pp. t12-t26.
5. Purtov Y.A., Glazunova O.A., Antipov S.S. et al. // *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2014, Vol. 12 (2), pp. 1441006-1-1441006-17.
6. Oshima T., Ishikawa S., Kurokawa K. et al. // *DNA Res.*, 2006, Vol. 13(4), pp. 141-153.
7. Lucchini S., Rowley G., Goldberg M.D. et al. // *PLoS Pathog.*, 2006, Vol. 2(8), pp. e81.
8. Seila A.C., Calabrese J.M., Levine S.S. et al. // *Science*, 2008, Vol. 322, pp. 1849-1851.
9. Preker P., Nielsen J., Kammler S. et al. // *Science*, 2008, Vol. 322, pp. 1851-1854.
10. Core L.J., Waterfall J.J., Lis J.T. // *Science*, 2008, Vol. 322, pp.1845-1848.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва, Мир, 1984, 479 с.
12. H.Schägger, G. Von Jagow // *Anal. Biochem.* 1987. Vol.166. pp. 368-379
13. Тутукина М.Н., Швырева У.С., Озолин О.Н. // Сорбционные и хроматографические процессы, 2015, Т. 15, № 3, С. 435-442.
14. Calhoun L.N., Kwon Y.M. // *J. Appl. Microbiol.*, 2011, Vol.110(2), pp.375-386.
15. Michel F.M., Barron V., Torrent J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, Vol. 107(7), pp.2787-2792.
16. Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A. et al. // *J. Bacteriol.*, 1999, Vol. 181(20), pp. 6361-6370.
17. Ghatak P., Karmakar K., Kasetty S., Chatterji D. // *PLoS One*, 2011, Vol. 6(1), pp. e16019.
18. Charollais J., Pflieger D., Vinh J. et al. // *Mol. Microbiol.*, 2003, Vol. 48(5), pp. 1253-1265.
19. Iost I., Dreyfus M. // *Nature*, 1994, Vol. 372(6502), pp.193-196.
20. Vincent H.A., Deutscher M.P. // *J. Mol. Biol.*, 2009, Vol. 387(3), pp. 570-583.
21. Vincent H.A., Deutscher M.P. // *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284(1), pp. 486-494.
22. Smagowicz W.J., Scheit K.H. // *Nucleic Acids Res.*, 1978, Vol. 6, pp. 1919-1932.
23. Grachev M.A., Zaychikov E. F., Ivanova E. M. et al. // *Nucleic Acids Res.*, 1984, Vol. 12(22), pp. 8509-8524.
24. Goldman S.R., Sharp J.S., Vvedenskaya I.O. et al. // *Mol. Cell.*, 2011, Vol. 42(6), pp. 817-825.
25. Ha M, Kim V.N. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 15(8), pp.509-524.

References

1. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N. et al., *Nucleic Acids Res.*, 2009, Vol. 37, pp. 4919-4931, DOI: 10.1093/nar/gkp490.
2. Panyukov V.V., Ozoline O.N., *PLoS One*, 2013, Vol. 8(5), pp.e62601, DOI: 10.1371/journal.pone.0062601.
3. Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Masulis I.S. et al., *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2011, Vol. 28, pp. 1128-1129.
4. Panyukov V.V., Kiselev S.S., Shavkunov K.S. et al., *Math Biol Bioinform*, 2013, Vol. 8(2), pp.t12-t26.
5. Purtov Y.A., Glazunova O.A., Antipov S.S. et al., *J. Bioinform. and Comput. Biol.*, 2014, Vol. 12 (2), pp. 1441006-1-1441006-17, DOI: 10.1142/S0219720014410066.
6. Oshima T., Ishikawa S., Kurokawa K. et al., *DNA Res.*, 2006, Vol. 13(4), pp. 141-153.
7. Lucchini S., Rowley G., Goldberg M. D. et al., *PLoS Pathog.*, 2006, Vol. 2(8), e81.
8. Seila A.C., Calabrese J.M., Levine S.S. et al., *Science*, 2008, Vol. 322(5909), pp.1849-1851, DOI: 10.1126/science.1162253.
9. Preker P., Nielsen J., Kammler S. et al., *Science*, 2008, Vol. 322(5909), pp.1851-1854, DOI: 10.1126/science.1164096.
10. Core L.J., Waterfall J.J., Lis J.T., *Science*, 2008, Vol. 322(5909), pp.1845-1848, DOI: 10.1126/science.1162228.
11. Maniatis T., Fritch E., Sambrook G. *Metody geneticheskoy ingenerii.*

- Молекулярное клонирование. Moscow, Mir, 1984, 479 p.
12. Schägger H., Von Jagow G., *Anal. Biochem.*, 1987, Vol.166, pp. 368-379
13. Tutukina M.N., Shvyreva U.S., Ozoline O.N., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2015, Vol. 15, No 3, pp. 435-442.
14. Calhoun L.N., Kwon Y.M., *J. Appl. Microbiol.*, 2011, Vol.110(2), pp.375-386, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04890.x.
15. Michel F.M., Barron V., Torrent J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2010, Vol. 107(7), pp.2787-2792, DOI: 10.1073/pnas.0910170107.
16. Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A. et al., *J. Bacteriol.*, 1999, Vol. 181(20), pp. 6361-6370.
17. Ghatak P., Karmakar K., Kasetty S., Chatterji D., *PLoS One.*, 2011, Vol. 6(1), pp. e16019, DOI: 10.1371/journal.pone.0016019.
18. Charollais J., Pflieger D., Vinh J. et al., *Mol. Microbiol.*, 2003, Vol. 48(5), pp.1253-1265.
19. Iost I., Dreyfus M., *Nature*, 1994, Vol. 372(6502), pp.193-196.
20. Vincent H.A., Deutscher M.P., *J. Mol. Biol.*, 2009, Vol. 387(3), pp. 570-583, DOI: 10.1016/j.jmb.2009.01.068.
21. Vincent H.A., Deutscher M.P., *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284(1), pp. 486-494, DOI: 10.1074/jbc.M806468200..
22. Smagowicz W.J., Scheit K.H., *Nucleic Acids Res.*, 1978, Vol. 6., pp.1919-1932.
23. Grachev M.A., Zaychikov E.F., Ivanova E.M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, Vol. 12(22), pp.8509-8524.
24. Goldman S.R., Sharp J.S., Vvedenskaya I.O. et al., *Mol. Cell*, 2011, Vol.42(6), pp.817-825, DOI: 10.1016/j.molcel.2011.
25. Ha M, Kim VN., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2014, Vol. 15(8), pp.509-524. DOI: 10.1038/nrm3838

Швырева Ульяна Сергеевна – аспирант лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пущино

Тутукина Мария Николаевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Пущино

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

Shvyreva Uliana S. - PhD student in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, e-mail: uliana.shvyreva@gmail.com

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, e-mail: maria@icb.psn.ru

Ozoline Olga N. - Dr.Sci., professor, Head of the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, e-mail: ozoline@rambler.ru