

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ 6S РНК БАКТЕРИЙ

Обзор

© 2015 О.Ю. Буренина¹, Д.А. Елкина¹,
Р.К. Хартманн², Т.С. Орецкая¹, Е.А. Кубарева^{3*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)932-8846

² Institut fuer Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universitaet Marburg,
Germany, D-35037 Marburg, Marbacher Weg 6; fax: +49(6421)28-2585,
E-mail: roland.hartmann@staff.uni-marburg.de

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: kubareva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.07.15

После доработки 21.07.15

Малые некодирующие РНК (нкРНК) – это нетранслируемые транскрипты длиной до 300 нуклеотидных остатков. Регуляция клеточных процессов с помощью таких нкРНК наиболее разнообразна в клетках эукариот, однако многие нкРНК найдены и в прокариотических организмах. Одной из наиболее известных малых нкРНК прокариот является 6S РНК, обнаруженная во всех бактериальных классах. Благодаря консервативной вторичной структуре, содержащей большую центральную «петлю», фланкированную длинными двуспиральными фрагментами, 6S РНК способна связывать холоферменты РНК-полимеразы (РНКП) и блокировать их активность. В результате происходит ингибирование транскрипции многих генов. По данным сравнительного транскриптомного анализа 6S РНК-зависимая регуляция транскрипции изменяет уровень экспрессии сотен генов, участвующих в различных клеточных процессах. Уникальным свойством 6S РНК является ее способность в определенных условиях служить матрицей для синтеза коротких РНК (пРНК), комплементарных центральной части молекулы. Длина и количество пРНК варьируются в зависимости от физиологического статуса клеток. Синтез пРНК чрезвычайно важен, поскольку приводит к высвобождению РНКП и обеспечивает обратимость процесса ингибирования. Аналогичный механизм описан для некодирующей В2 РНК мыши, ингибирующей активность РНКП II. Это позволяет предположить общность эволюционного происхождения нкРНК-зависимой регуляции РНКП и свидетельствует о ее исключительной значимости для клетки. В настоящем обзоре суммированы данные о свойствах и функциях 6S РНК из разных бактерий, а также об особенностях синтеза пРНК. Большинство аспектов функционирования 6S РНК рассмотрены на примере 6S РНК из *E. coli* как наиболее изученной модельной системе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: некодирующие РНК, регуляция транскрипции, РНК-полимераза, 6S РНК.

РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ нкРНК

Известно, что геномы высших эукариот состоят в основном (~98%) из последовательностей, не содержащих гены белков, в то время как в бактериальных геномах количество таких последовательностей не превышает 2%. Тем не менее в базе данных BSRD (Bacterial Small Regulatory

RNA Database, <http://www.bac-srna.org/BSRD/index.jsp#>) можно найти информацию о более чем 30 000 различных нкРНК из 783 видов прокариотических организмов [1]. В т.ч. для нескольких десятков из них, принадлежащих главным образом к семействам энтеробактерий и бацилл, число идентифицированных в их геномах нкРНК превышает 100. Как правило, нкРНК помогают бактерии приспосабливаться к изменениям окружающей среды путем воздействия на инициацию транскрипции, посттранскрипционную регуляцию, инициацию трансляции и модификацию мембран. Многие нкРНК являются крайне необходимыми регуляторными элементами при клеточном ответе на стресс или заражении бактериофагами [2, 3].

Принятые сокращения: нкРНК – некодирующие РНК, тмРНК – транспортно-матричная РНК, РНКП – РНК-полимераза, н.о. – нуклеотидный остаток, NTP – нуклеозидтрифосфаты, пРНК – РНК-продукт, TSS – стартовая точка транскрипции.

* Адресат для корреспонденции.

Большинство из них выполняют свои функции за счет наличия участка, комплементарного мРНК-мишени, и, как следствие, изменяют стабильность и/или влияют на трансляцию последней. Такие нкРНК являются основными участниками посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [4, 5]. Например, OxyS РНК транскрибируется в клетке в ответ на окислительный стресс и, взаимодействуя с участком связывания рибосомы в мРНК, блокирует трансляцию генов *fhlA* и *rpoS*, кодирующих, соответственно, транскрипционный активатор и σ^S -субъединицу РНКП [6]. В то же время трансляцию мРНК гена *rpoS* способны, наоборот, активировать другие малые нкРНК — RprA и DsrA РНК, экспрессирующиеся в условиях осмотического шока и при пониженных температурах соответственно. Взаимодействуя с 5'-областью мРНК гена *rpoS*, эти нкРНК «расплетают» шпилечную структуру, препятствующую посадке рибосомы [7]. Интересный пример регуляции описан для RyhB РНК, которая вызывает дестабилизацию мРНК генов, вовлеченных в метаболизм и утилизацию железа и, кроме того, подавляет экспрессию ингибитора своей собственной транскрипции — белка Fur [8]. Эффективное функционирование перечисленных нкРНК обеспечивается за счет их взаимодействия с РНК-шапероном Hfq, который способствует образованию «правильных» комплементарных дуплексов с мишенями мРНК [9].

Также в литературе описаны нкРНК, которые непосредственно связываются с регуляторными белками и модулируют их активность. Прежде всего это CsrV и CsrC РНК, образующие вместе с белком CsrA регуляторную систему CsrABC (от англ. «carbon storage regulator») [10]. Белок CsrA, связываясь с нетранслируемой областью различных мРНК вблизи последовательности Шайна–Дальгарно, препятствует посадке рибосомы и ингибирует трансляцию. Делеция гена *csrA* изменяет уровень экспрессии ~10% генов в бактериях. Активность этого фермента блокируется с помощью РНК CsrC и CsrV, состоящих, соответственно, из 9 и 18 шпилечных структур, петли которых содержат участок узнавания белка CsrA — последовательность 5'-GGA-3'. Как следствие, CsrC и CsrV РНК могут связывать до 9–18 молекул белка CsrA и эффективно препятствовать его взаимодействию с мРНК [11]. Аналогом регуляторной системы CsrABC в клетках *Pseudomonas fluorescens* и *Legionella pneumophila* являются системы RsmXYZ–RsmA и RsmXY–RsmA соответственно [12]. Делеции последовательностей ДНК, кодирующих RsmX и RsmY РНК, приводили к существенному снижению вирулентности *L. pneumophila* [13]. Ана-

логичные системы были также найдены в клетках *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium* и *Yersinia pseudotuberculosis* [14]. Еще одной малой нкРНК, связывающейся с белком и регулирующей тем самым его активность, является 70-звенная Rcd РНК, закодированная в плазмиде ColE1 *E. coli*. Мишенью Rcd РНК является триптофаназа TrpA, катализирующая разложение триптофана с образованием индола, аммиака и пируват-иона. Точный механизм данного процесса не изучен, однако Rcd РНК повышает сродство белка к триптофану, что приводит к активной деградации последнего и повышению концентрации индола в клетке, вследствие чего прекращается активное деление *E. coli* [15]. Интересным примером также является система токсин–антитоксин (ТА) ToxI–ToxN, обнаруженная у *Pectobacterium atrosepticum* и *Bacillus thuringiensis*. Как правило, подавление экспрессии/функционирования белка-токсина обеспечивается за счет связывания его мРНК с комплементарной РНК антитоксина (системы ТА I типа) или благодаря эндонуклеазной или регуляторной активности белка-антитоксина (системы ТА II типа). Уникальность системы ToxI–ToxN заключается в непосредственном взаимодействии 36-звенной РНК ToxI с белком-токсином ToxN (с образованием гетерогексамера, содержащего три молекулы ToxN и три ToxI-лиганда), что приводит к потере рибонуклеазной функции ToxN [16, 17].

Однако наиболее известной регуляторной нкРНК бактерий является 6S РНК — глобальный ингибитор транскрипции, связывающийся с холоферментом РНК-полимеразы (РНКП) и блокирующий ее доступ к промоторам ДНК. За последние 15 лет после обнаружения функциональной роли 6S РНК *E. coli* [18] различными научными группами были не только подробно охарактеризованы свойства 6S РНК и особенности ее взаимодействия с РНКП, но и открыт принципиально новый, не описанный ранее для бактерий, механизм синтеза пРНК — коротких РНК-продуктов, комплементарных внутренним участкам 6S РНК. Развитие методов секвенирования и транскриптомного анализа позволило идентифицировать гены 6S РНК практически во всех классах прокариотических организмов [19, 20]. Результаты изучения свойств 6S РНК из отдельных видов бактерий подтверждают общность их функций как ингибиторов РНКП и глобальный масштаб их влияния на экспрессию различных генов, что позволяет выделить их в отдельный класс регуляторов транскрипции, представляющих собой РНК. С другой стороны, в большинстве описанных случаев при потере 6S РНК не наблюдается последствий, критич-

ных для жизнеспособности клетки в стандартных условиях роста. Эти факты свидетельствуют о существовании альтернативных механизмов регуляции, компенсирующих отсутствие 6S РНК и/или поддерживающих равновесие между активной и неактивной формами РНКП. Проводя аналогию с эукариотическими В2 и Alu нкРНК [21], взаимодействующими с РНКП II, можно предположить существование во всех живых системах отдельного механизма РНК-зависимого контроля транскрипции, имеющего общую эволюцию.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ПЕРВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 6S РНК

Впервые 6S РНК длиной 184 н.о. была обнаружена Хиндли в клетках *E. coli* штамма MRE600 еще в 1967 г. при выделении клеточной тРНК [22]. Несмотря на то, что 6S РНК стала одной из первых секвенированных молекул РНК [23], ее функциональная роль в клетке оставалась неизвестной на протяжении более 30 лет после открытия.

6S РНК демонстрировала высокую устойчивость к гидролизу и присутствовала во всех протестированных линиях *E. coli*, а также в родственной ей бактерии *Shigella dysenteriae* в количествах, сравнимых с рРНК [23]. В последующих исследованиях была зафиксирована транскрипция прекурсора 6S РНК *E. coli*, содержащего восемь дополнительных н.о. на 5'-конце молекулы, и идентифицирован ген *ssrS*, кодирующий 6S РНК и представленный в геноме *E. coli* единственной копией [24]. Примерно в то же время из клеток HeLa была выделена 7S (7SL) РНК — компонент РНК-белкового комплекса SRP, отвечающего за котрансляционную транслокацию белков через мембрану эндоплазматического ретикула [25]. Однако гипотеза об участии 6S РНК в регуляции секреции белков не была подтверждена, поскольку ни делеция гена *ssrS*, ни его суперэкспрессия абсолютно не влияли на жизнеспособность *E. coli* [26].

Позднее 6S РНК длиной ~180 н.о. была обнаружена в бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [27]. Несмотря на то, что процент гомологии между 6S РНК *E. coli* и 6S РНК *P. aeruginosa* составлял всего 60%, авторами была предложена общая для обеих РНК вторичная структура в виде симметричной частично самокомплементарной шпильки с обширным расплетенным участком в центре. Попытки использовать ³²P-меченую 6S РНК *P. aeruginosa* в качестве зонда для гибридизации с геномными ДНК других бактерий (*Thermus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearother-*

ophilus и *Haloarcula marismortui*) не увенчались успехом.

В итоге изучение структуры и свойств 6S РНК было приостановлено вплоть до 2000 г. К тому времени в *E. coli* помимо рибосомной 5S и тРНК были обнаружены еще девять коротких нкРНК, вовлеченных в различные механизмы регуляции жизнедеятельности клетки [28]. Например, были охарактеризованы 10Sa и 10Sb РНК (M2 и M1 РНК), являющиеся, соответственно, транспортно-матричной РНК (тмРНК), участвующей в терминации трансляции [29], и рибонуклеиновой составляющей бактериальной РНКазы Р, ответственной за процессинг тРНК [30]; упомянутые выше OxyS и DsrA РНК, а также DicF РНК, суперэкспрессия которой препятствовала делению клетки [31]. Большое количество нкРНК, взаимодействующих как с белками, так и с другими РНК, было обнаружено и в клетках эукариот. Такое многообразие функций лишь незначительного количества известных на тот момент малых нкРНК вызвало стремительно возрастающий интерес к данной теме и заставило ученых пересмотреть концепцию, согласно которой основные роли РНК в клетке отводились мРНК, рРНК и тРНК. Настоящим открытием стало исследование, опубликованное в журнале «Cell» группой проф. Вассарман [18], в котором впервые было обнаружено, что 6S РНК *E. coli* может ингибировать транскрипцию за счет взаимодействия с РНКП. В этой работе было продемонстрировано участие 6S РНК в регуляции транскрипции и предложен механизм ее функционирования в клетке, общепринятый в настоящее время.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ 6S РНК В *E. coli*

РНКП является важнейшим ферментом в клетке, осуществляющим синтез РНК с матрицы ДНК. Бактериальная РНКП состоит из пяти субъединиц: двух α , β , β' и ω , образующих кор-фермент, способный к элонгации транскрипции. Однако узнавание промоторов и инициация транскрипции возможны только холоферментом РНКП, содержащим в своем составе дополнительную σ -субъединицу. В нормальных условиях роста клетки основным фактором транскрипции в *E. coli* является σ^{70} , но еще шесть альтернативных вариантов σ -факторов (σ^{54} , σ^{38} (σ^S), σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} и σ^{19}) отвечают за транскрипцию с тех или иных промоторов, в т.ч. в стрессовых условиях [32].

Впервые взаимодействие 6S РНК с РНКП было обнаружено при соосаждении РНКП ан-

тителами к кор-ферменту. 6S РНК являлась единственным лигандом олигонуклеотидной природы, присутствие которого детектировалось в осажденных фракциях. При использовании нокаутной по гену *ssrS* клеточной линии никаких РНК, соосажающихся с ферментом, зафиксировано не было [18]. В экспериментах по комплексообразованию синтетической 6S РНК с различными холоферментами РНКП в условиях *in vitro* было установлено, что 6S РНК не способна связывать свободные σ -субъединицы, однако может неспецифически связывать кор-фермент РНКП. Помимо высокого сродства к холоферменту σ^{70} -РНКП было продемонстрировано незначительное связывание 6S РНК и с σ^S -РНКП, транскрибирующей гены, активные в стационарной фазе роста клетки [33, 34]. Количественно содержание 6S РНК в экспоненциальной и стационарной фазах роста было оценено, соответственно, как ~ 1000 и $\sim 10\ 000$ копий на одну клетку [18], что в последнем случае как минимум в несколько раз превышает число молекул РНКП. Как следствие, практически вся σ^{70} -РНКП в течение 24 ч после начала культивации клеток (в поздней стационарной фазе роста) оказывалась в комплексе с 6S РНК, тогда как σ^S -РНКП оставалась активной. Высокое сродство 6S РНК к РНКП объяснялось ее конкуренцией с промоторами ДНК за связывание активного центра фермента: было установлено, что 6S РНК взаимодействует с районом 4.2 фактора σ^{70} , который отвечает за узнавание промоторного элемента -35 [35–37]. Помимо этого методом ковалентного связывания биомолекул (кроссликинга) под действием УФ-света были зафиксированы контакты 6S РНК с β - и β' -субъединицами РНКП [18, 33].

Ингибирующий эффект 6S РНК *E. coli*, проявляющийся в снижении выхода синтезирующейся РНК, был неоднократно продемонстрирован в экспериментах по транскрипции *in vitro* на примере как σ^{70} -, так и σ^S -зависимых промоторов ДНК [18, 33]. Также была оценена активность различных промоторов в клетках с делецией гена *ssrS* с помощью β -галактозидазного теста. В этом случае ингибирующий эффект 6S РНК наблюдали лишь для некоторых из выбранных σ^{70} -зависимых промоторов, в то же время почти все протестированные σ^S -зависимые промоторы, наоборот, активировались в присутствии 6S РНК [35, 38]. Поскольку 6S РНК не взаимодействует с промоторами, а лишь конкурирует с ними за связывание РНКП, очевидно, что степень ингибирования транскрипции должна зависеть от силы промотора и его сродства к ферменту. На основе экспериментальных данных было высказано предположение, что

действие 6S РНК более избирательно по отношению к генам, содержащим расширенный промоторный элемент -10 с d(TG) в положении -12 и «слабую» промоторную область -35 . Эта теория была частично подтверждена данными транскриптомного анализа нокаутного по гену *ssrS* штамма *E. coli* с использованием технологии ДНК-микрочипов. Среди идентифицированных генов были выбраны те, для которых были известны или достоверно предсказаны промоторные области. По результатам статистического анализа активация экспрессии генов в отсутствие 6S РНК наблюдалась для 77% промоторов, содержащих расширенный промоторный элемент -10 , и 62% промоторов, содержащих промоторный элемент -35 с 3–6 нуклеотидами, отличными от консенсусной последовательности. Для промоторов с менее чем двумя вырожденными нуклеотидами в области -35 активация транскрипции в отсутствие 6S РНК была обнаружена лишь в 16% случаев. В целом делеция гена 6S РНК в стационарной фазе клеточного роста приводила к активации экспрессии 49% от общего числа генов *E. coli* с аннотированными промоторными областями [35].

В другой работе методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией на нескольких модельных генах было продемонстрировано, что 6S РНК *in vivo* способна ингибировать синтез РНК как с σ^{70} -зависимых, так и с σ^S -зависимых промоторов, причем не только в ранней стационарной, но и в средней экспоненциальной фазе роста клеток [39]. Транскриптомный анализ общей РНК, выделенной из клеток в этих фазах роста, позволил идентифицировать, соответственно, 245 и 273 гена, экспрессия которых изменялась более чем в 1,5 раза в нокаутном по гену *ssrS* штамме по сравнению с клетками дикого типа, причем для 46–51% генов было продемонстрировано снижение уровня транскрипции в отсутствие 6S РНК. Несмотря на связывание 6S РНК исключительно с σ^{70} -РНКП, изменение уровня экспрессии (как повышение, так и понижение) наблюдалось и для генов, промоторы которых являлись σ^S -, σ^{32} - и σ^{24} -зависимыми. Максимальный ингибирующий эффект 6S РНК в экспоненциальной фазе был обнаружен для оперонов, кодирующих белки, вовлеченные в метаболизм пуринов, деградацию аминокислот, а также многие стрессовые факторы транскрипции и трансляции. В стационарной фазе 6S РНК ингибировала экспрессию еще большего количества транскрипционных факторов. Максимальный эффект был отмечен для белка SmbP, участвующего вместе с тРНК в терминации трансляции при остановке рибосомы из-за повреждений мРНК.

Неожиданным результатом оказалась 6S РНК-зависимая активация экспрессии многих белков, основное количество которых в экспоненциальной фазе роста клеток также составляли регуляторы транскрипции. Очевидно, что 6S РНК не может напрямую активировать экспрессию генов, тем не менее глобальные изменения белкового состава транскрипционного аппарата клетки, вызванные отсутствием 6S РНК, свидетельствуют о существовании комплексных, вероятно, многостадийных процессов регуляции. В стационарной фазе роста клеток максимальный активирующий эффект 6S РНК наблюдался для белков трансляционного аппарата и рРНК. Однако в данном случае это явление также носило косвенный характер, поскольку основной причиной было 6S РНК-зависимое снижение концентрации эффектора небелковой природы — гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфата (ppGpp), ингибирующего синтез рРНК [39]. А именно, делеция гена 6S РНК в ранней стационарной фазе приводила к активации экспрессии гена *relA*, кодирующего ppGpp-синтазу I [40]. Таким образом, было установлено, что, несмотря на однозначность ингибирующего эффекта 6S РНК по отношению к ее мишени — РНКП, в масштабе клетки эта нкРНК отвечает за разнонаправленную регуляцию множества различных процессов и выполняет роль глобального фактора транскрипции.

Как упоминалось выше, нокаут гена 6S РНК не приводил к ярко выраженным негативным последствиям для клеток [18, 26]. Небольшое снижение жизнеспособности мутантного штамма (в 3–5 раз) удалось зафиксировать только после 20-дневной инкубации клеточной культуры. Более значимый эффект наблюдался при конкурентном выращивании нокаутных клеток вместе с клетками дикого типа. В этом случае уже на 2–3-й день совместного культивирования количество выживших колоний мутантного штамма снижалось в 20 раз, а на 4–5-й день — в 70 раз [38]. В случае дополнительной делеции гена *groS* (кодирующего σ^S -субъединицу РНКП) жизнеспособность нокаутной клеточной линии в поздней стационарной фазе уже после 24 ч культивирования уменьшалась в 2,5 раза по сравнению с клетками, содержащими 6S РНК. Еще менее жизнеспособной оказалась σ^S -дефектная клеточная линия, суперэкспрессирующая 6S РНК [18]. Очевидно, что в последнем случае повышенный синтез 6S РНК приводил к полному блокированию σ^{70} -РНКП, и в отсутствие основного холофермента стационарной фазы σ^S -РНКП транскрипция практически не осуществлялась. Таким образом, было доказано, что 6S РНК необходима для успешного выживания

клетки в условиях дефицита питательных веществ. Отсутствие регуляции активности σ^{70} -РНКП в нокаутном по гену *ssrS* штамме должно приводить к преждевременному расходу ресурсов клетки и, как следствие, снижению ее жизнеспособности в стационарной фазе роста.

Еще один фенотип клеток с делецией гена 6S РНК был обнаружен в условиях щелочного стресса. При выращивании в среде с постоянным pH 9,3 в поздней стационарной фазе (после 48 ч культивирования) оптическая плотность мутантной клеточной культуры была в 3–5 раз выше, чем у культуры клеток дикого типа. При понижении значений pH до 9,1 разница в жизнеспособности штаммов уменьшалась в 2 раза, а при pH 8,1 — исчезала полностью. Известно, что длительное культивирование *E. coli* в питательных средах, как правило, приводит к их защелачиванию до значений pH > 8 уже на вторые сутки и дальнейшему повышению pH вплоть до ~9. Таким образом, высокие значения pH, при которых был обнаружен данный фенотип делеционного штамма, отражают состояние клеток в поздней стационарной фазе, где влияние 6S РНК наиболее ярко выражено. Как оказалось, положительный эффект нокаута гена *ssrS* на рост клеток в щелочных условиях напрямую связан с возрастанием уровня экспрессии транскрипционного фактора PspF, который, в свою очередь, активирует транскрипцию оперонов *pspABCDE* и *pspG*, кодирующих белки, необходимые для клеточного ответа на различные стрессы (в т.ч. щелочной). Т.е. в обычных условиях 6S РНК ингибирует транскрипцию гена *pspF* и предотвращает излишнюю экспрессию стрессовых белков [41].

Ингибирование экспрессии PspF является наглядным примером влияния 6S РНК на регуляцию процессов жизнедеятельности клетки. Однако согласно данным транскриптомного анализа, это лишь один из множества генов, регулируемых 6S РНК. Очевидно, что функциональная роль 6S РНК гораздо шире, чем предполагали ранее, и ее функция распространяется не только на σ^{70} -зависимые промоторы генов в стационарной фазе роста клеток, но и на огромное количество других генов, экспрессия которых необходима в тех или иных условиях. Жизнеспособность нокаутных по 6S РНК клеточных линий свидетельствует о существовании альтернативных способов регуляции транскрипции (возможно, активируемых при дефекте синтеза 6S РНК), которые полностью или частично компенсируют ее отсутствие в клетке. Тем не менее 6S РНК играет важную роль при выживании клетки в условиях дефицита питательных веществ и других стрессовых условиях.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ 6S РНК *E. coli*

Ген *ssrS*, кодирующий 6S РНК *E. coli*, транскрибируется совместно с геном *ygfA* с двух промоторов P1 (проксимальный) и P2 (дистальный) (рис. 1) с последующим расщеплением бицист-

ронной РНК [42]. Функция белка, кодируемого геном *ygfA*, была выяснена относительно недавно [43] и, по всей видимости, никак не связана с ролью 6S РНК в клетке: YgfA является 5-формилтетрагидрофолатциклолигазой и ингибирует активность различных фолатзависимых ферментов. Следующий за геном *ygfA* ген *sibC* коди-

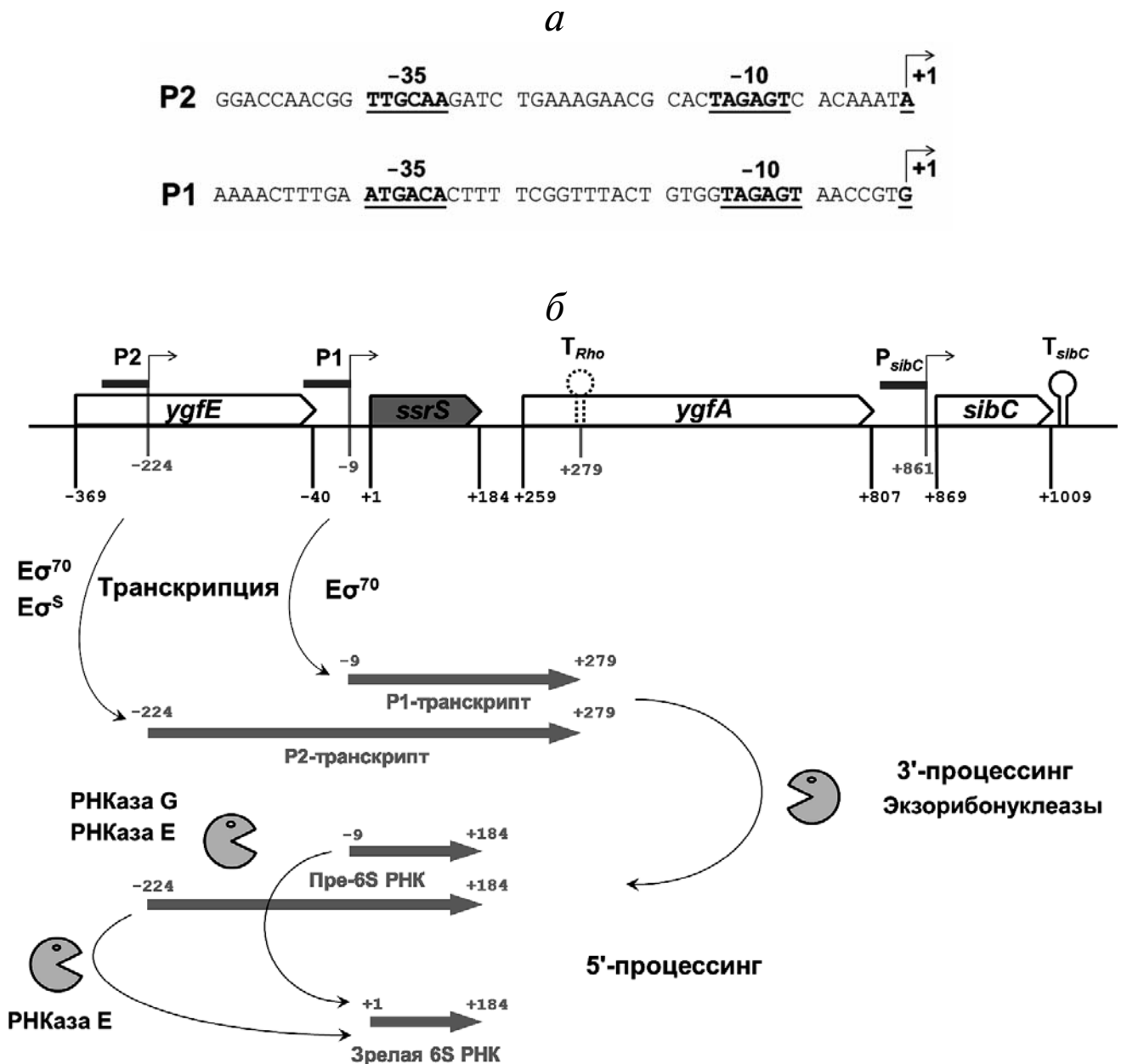


Рис. 1. Схема генетической организации оперона *ssrS*–*ygfA* *E. coli* и биогенезиса 6S РНК по данным Кейлер с соавт. [29] и Браун и Эллис [47]. *a* – Нуклеотидные последовательности промоторных областей P1 и P2. Элементы –35 и –10 и выделены жирным шрифтом и подчеркнуты, TSS (+1) отмечены стрелками; *b* – модель транскрипции и последующего процессинга 6S РНК *E. coli*. Стрелками обозначены направления генов. Относительные позиции основных генетических элементов указаны цифрами от начала гена *ssrS* (+1). Шпильками изображены терминаторы транскрипции гена *sibC* и Rho-зависимый терминатор транскрипции гена *ssrS*. Холоферменты РНКП, содержащие различные σ -факторы, обозначены как E σ^{70} и E σ^S .

рует нетранслируемую РНК, точная функция которой на сегодняшний день неизвестна. Ген *ygfE*, расположенный непосредственно перед геном *ssrS*, кодирует белок ZapA, который участвует в полимеризации белка FtsZ в так называемое Z-кольцо, формирующее перегородку между двумя дочерними клетками. Оба промотора, с которых происходит транскрипция гена *ssrS*, активны *in vivo*. Транскрипция с P2 может осуществляться как σ^{70} -РНКП, так и σ^S -РНКП, в то время как P1 является исключительно σ^{70} -зависимым. Таким образом, в экспоненциальной фазе роста клетки транскрипция 6S РНК *E. coli* происходит одновременно с двух промоторов, причем активность P1 в 5 раз выше, чем P2. При переходе в стационарную фазу проксимальный промотор становится неактивным, а транскрипция с дистального промотора продолжается [42].

В условиях *in vitro* транскрипция оперона *ssrS*–*ygfA* останавливается только перед терминатором гена *sibC* (рис. 1). В условиях *in vivo* терминация транскрипции обоих промоторов гена *ssrS* является Rho-зависимой и происходит ориентировочно в позиции +279 (относительно стартовой точки транскрипции (TSS) промотора P1). Последующий 3'-процессинг обоих вариантов пре-6S РНК неидентифицированными к настоящему моменту экзорибонуклеазами приводит к удалению дополнительных ~90 н.о., причем правильное специфическое разрезание транскрипта наблюдается и в отсутствие Rho-зависимой терминации [44]. Затем обе формы предшественников 6S РНК подвергаются процессингу с 5'-конца эндорибонуклеазами: РНКазой E в случае длинного P2-транскрипта и РНКазой E и G в случае короткого P1-транскрипта [42]. Более протяженный вариант пре-6S РНК подвергается процессингу с большей эффективностью (~13-кратной), что, вероятно, обусловлено необходимостью быстрого возрастания концентрации зрелой 6S РНК в стационарной фазе роста клеток, когда активен только промотор P2.

Поскольку ингибирование транскрипции в присутствии 6S РНК наблюдается главным образом в случае σ^{70} -зависимых промоторов, можно предположить, что 6S РНК может ингибировать и свою собственную транскрипцию. Для изучения такой возможности P1- и P2-промоторы гена *ssrS* были клонированы в промоторную область гена *lacZ*. Было показано, что делеция гена 6S РНК никак не влияет на эффективность транскрипции ее собственных промоторов *in vivo*. В то же время суперэкспрессия 6S РНК вызывала повышение уровня транскрипции с промотора P1 и понижала активность промотора P2. Этот эффект нивелировался дополнительным пока-

том ДНК-связывающего белка Fis, регулирующего экспрессию ~20% генов [45]. Влияние Fis на экспрессию 6S РНК наряду с факторами транскрипции H-NS, LRP и StpA, в частности играющими важную роль в адаптации клетки к стрессовым условиям, было изучено в работе Нойса с соавт. [46]. Делеции генов, кодирующих эти белки, приводили к возрастанию экспрессии 6S РНК в ~2–3 раза. Негативное влияние всех четырех факторов на синтез 6S РНК было подтверждено экспериментами по транскрипции *in vitro*. Интересно, что в случае белка Fis наблюдался двойной эффект: ингибирование транскрипции гена *ssrS* с промотора P2 и незначительная активация транскрипции *ssrS* с промотора P1. Полученные данные коррелировали с результатами футпринтинга ДНКазой I комплекса Fis с промоторной областью гена *ssrS*: белок связывался с участком ДНК между двумя промоторами, блокируя лишь TSS промотора P2. Три других фактора защищали от гидролиза более обширные области ДНК, перекрывающиеся с обоими промоторами [46].

В условиях *in vitro* не удалось выявить влияние на экспрессию 6S РНК основных участников клеточного ответа на стрессовые условия, взаимодействующих с РНКП – транскрипционного фактора DksA и эффектора ppGpp, хотя синтез последнего, как упоминалось ранее, напрямую связан с функционированием 6S РНК [40]. Исходя из известных на сегодняшний день данных, можно заключить, что транскрипция и процессинг 6S РНК в *E. coli* регулируется с помощью различных механизмов (в т.ч. и конкурирующих между собой) при участии разнообразных факторов, большинство из которых пока неизвестны.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ 6S РНК И ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РНК-ПОЛИМЕРАЗой

В 2005 г. были опубликованы две работы, посвященные сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей предсказанных на тот момент 6S РНК из различных бактерий [19, 47]. Несмотря на низкий процент гомологии первичных структур, все проанализированные РНК с высокой вероятностью образовывали протяженную шпильку с большим расплетенным участком в центре. Для 6S РНК *E. coli* эти данные были также подтверждены экспериментально методом, называемым в англоязычной литературе «пробингом» и представляющим собой определение вторичной структуры молекулы нуклеиновой кислоты с помощью химичес-

ких реагентов или эндонуклеаз, взаимодействующих избирательно с ее одно- или двухцепочечными участками (рис. 2, а) [19, 48]. Кроме того, все известные последовательности 6S РНК γ -протеобактерий содержали четыре коротких консервативных элемента CRI–CRIV (от англ. «conservative region») длиной 6–13 н.о., впервые обнаруженных еще в 1987 г. [27]. Высокая консервативность вторичной структуры 6S РНК среди различных классов прокариот свидетельствовала о важности конформации этой нкРНК для ее

функционирования. Было высказано предположение, что 6S РНК имитирует промотор ДНК в его «открытом» комплексе с РНКП, что и обеспечивает ее связывание с ферментом [19, 34]. Действительно, мутантные формы 6S РНК *E. coli* с удаленной «верхней» или «нижней» частью центральной петли были неспособны связывать σ^{70} -РНКП и ингибировать транскрипцию модельного промотора *in vivo*. Замена этой области на самокомплементарный участок также приводила к полной потере сродства молекулы к

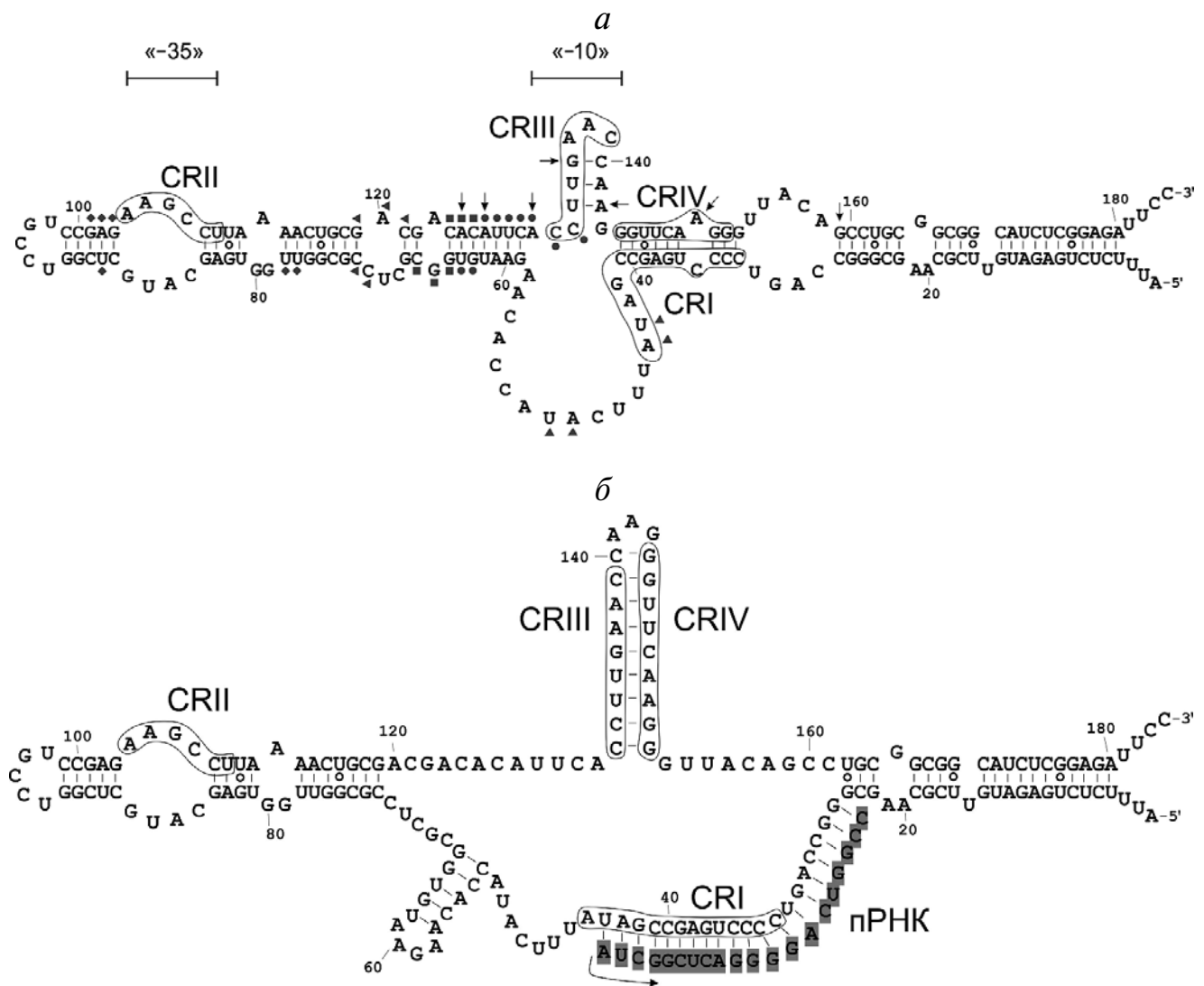


Рис. 2. Структурные особенности 6S РНК *E. coli*. а – Вторичная структура 6S РНК *E. coli* согласно данным Штойтн с соавт. [37], Тротошо с соавт. [41] и Бибрихер с соавт. [51]. Некомплементарные пары оснований UG обозначены знаком «О». Консервативные элементы CRI–CRIV выделены рамками. Символами отмечены н.о. 6S РНК, сближенные с различными а.о. того или иного района σ^{70} -субъединицы РНКП: квадраты – K376 $\sigma_{2.1}^{70}$; жирные точки – R422 $\sigma_{2.3}^{70}$; треугольники вершиной влево – K496 $\sigma_{3.1}^{70}$; треугольники вершиной вверх – S517 $\sigma_{3.2}^{70}$; ромбы – D581 $\sigma_{4.2}^{70}$. Стрелками отмечены н.о., образующие контакты с холоферментом РНКП по данным УФ-кросслинкинга [37]. Области, аналогичные промоторным элементам –35 и –10, отмечены как «–35» и «–10» соответственно; б – конформационные изменения 6S РНК *E. coli* в процессе синтеза пРНК (выделена серым)

РНКП. В то же время мутации, существенно не влияющие на вторичную структуру 6S РНК, не оказывали столь заметного эффекта на ее свойства [34]. С помощью масштабного скрининга различных мутантных и делеционных производных 6S РНК *E. coli* было показано, что нуклеотидные замены в участке, аналогичном промоторной области -35 (рис. 2, *a*), приводят к снижению сродства 6S РНК к РНКП, а их удаление полностью предотвращает связывание молекул [49].

Одной из первых стадий взаимодействия РНКП с промотором является связывание района 4.2 σ -фактора с элементом -35 . Наличие этого района σ^{70} -субъединицы также критично и для связывания РНКП с 6S РНК [35]. Анализ влияния единичных аминокислотных замен в районе 4.2 σ^{70} -субъединицы на комплексообразование РНКП с 6S РНК и модельным промотором показал, что участки связывания этих лигандов перекрываются, хотя и не совпадают полностью [36]. Последнее исследование РНК-белковых контактов между холоферментом σ^{70} -РНКП и 6S РНК было проведено в группе проф. Вагнера с использованием различных мутантных форм σ^{70} -фактора, конъюгированных с химической нуклеазой FeBAVE – (S)-1-(*p*-бром-ацетамидобензил)этилендиаминтетраацетатом железа (III) [37]. Как оказалось, помимо района 4.2 σ^{70} , взаимодействующего с двумя участками во внутренней шпильке 6S РНК (77–78 и 101–103 н.о.), не менее важным является взаимодействие доменов 3.1, 2.1 и 2.3 σ^{70} с нерегулярным двухцепочечным участком, фланкирующим центральную петлю 6S РНК с 3'-конца молекулы (рис. 2, *a*). Эти районы σ^{70} вовлечены в связывание промоторного элемента -10 и плавление ДНК вблизи TSS. Фактически во взаимодействии с РНКП принимает участие только половина молекулы 6S РНК (42–143 н.о.), являющаяся своеобразным аналогом промоторной области ДНК: все нуклеотидные замены в составе 6S РНК, находящиеся в данной области, приводили к полной или частичной потере сродства молекулы к РНКП. 3'-/5'-Концевой двухцепочечный участок 6S РНК, вероятно, выполняет структурную функцию, хотя не исключено его взаимодействие с β/β' -субъединицами РНКП.

Попытки закристаллизовать 6S РНК пока не увенчались успехом, однако с помощью программы 3dRNA была создана трехмерная модель полноразмерной молекулы, которая была совмещена с кристаллической структурой холофермента σ^{70} -РНКП *E. coli* (PDB-код: 4IGC) [37]. Как оказалось, центральная петля 6S РНК (42–58 н.о.) повторяет геометрию транскрипционного «пузыря» в ДНК-промоторе (от -11 до

$+5$ н.о. относительно положения TSS), а участок 6S РНК 59–93 н.о. действительно имитирует промоторную область ДНК от -12 до -42 н.о. относительно стартовой точки транскрипции. Короткая шпилька 133–143 н.о., существующая в «свободной» конформации 6S РНК (рис. 2, *a*) при связывании с РНКП, по всей видимости, расплавляется с образованием неструктурированного участка. Предполагается, что расплетенный участок РНК в районе 85–88 и 104–107 н.о. искажает регулярную А-форму двухцепочечной спирали РНК, расширяя большую бороздку и тем самым делая ее более доступной для взаимодействия с мотивом «спираль–поворот–спираль» района 4.2 σ^{70} -субъединицы [37].

6S РНК – МАТРИЦА ДЛЯ СИНТЕЗА пРНК

Неожиданным открытием стала обнаруженная способность 6S РНК, связываясь с активным центром РНКП, служить матрицей для синтеза коротких РНК-продуктов *de novo* [33, 50]. Полученные транскрипты были названы пРНК (от англ. «pRNA, product RNA»). Отметим, что случаи РНК-зависимой транскрипции, осуществляемой бактериальными ДНК-зависимыми РНКП, а также РНКП фагов T3 и T7 в условиях *in vitro*, описаны в литературе [51–53], однако 6S РНК стала первой и на сегодняшний день единственной идентифицированной РНК, способной переориентировать субстратную специфичность прокариотической ДНК-зависимой РНКП *in vivo*. Более того, синтез пРНК на матрице 6S РНК, как оказалось, играет важную функциональную роль в механизмах 6S РНК-зависимого ингибирования транскрипции.

В соответствии с предсказанной локализацией 6S РНК *E. coli* в активном центре РНКП синтез пРНК начинается с остатка U44, расположенного в центральной петле молекулы и образующего контакты с районом 3.2 σ^{70} -субъединицы (вместе с н.о. A45, A50 и U51, рис. 2, *a*). В ходе транскрипции синтезируется целый ряд коротких РНК длиной 2–24 н.о. с существенным преобладанием более длинных продуктов (~20 н.о.) [50]. По аналогии с транскрипцией с промотора ДНК фермент расплетает двухцепочечный участок 6S РНК, фланкирующий центральную петлю с 3'-/5'-конца молекулы, сдвигая транскрипционный «пузырь» по направлению синтеза пРНК (рис. 2, *b*). При этом происходит нарушение исходной конформации 6S РНК, а пРНК остается связанной с комплементарным ей участком, образуя РНК-РНК-дуплекс. Короткая шпильчатая структура, расположенная

напротив центральной петли с 3'-стороны 6S РНК, заменяется при этом на стабильную удлиненную шпильку (132–152 н.о.), которая образуется непосредственно между консервативными элементами CRIII и CRIV (рис. 2, б) [48]. Описанные изменения приводят к потере средства комплекса 6S РНК–пРНК к РНКП и его последующей диссоциации [33, 50, 54].

Синтез пРНК на матрице 6S РНК часто сравнивают с процессом abortивной транскрипции с промотора ДНК, когда РНКП, практически не изменяя своего положения относительно TSS, синтезирует короткие РНК-затравки длиной, как правило, не более 15 н.о. [55]. Однако 6S РНК-зависимая транскрипция является более сложным механизмом и состоит из нескольких стадий. В условиях дефицита нуклеозидтрифосфатов (NTP) РНКП действительно может синтезировать короткие пРНК длиной до 8 н.о., не приводящие ни к каким серьезным структурным перестройкам 6S РНК и диссоциирующие из комплекса 6S РНК–РНКП. В этом смысле такая транскрипция может рассматриваться как abortивная. Однако после добавления девятого н.о. к синтезирующейся цепи пРНК происходит диссоциация σ^{70} -субъединицы из холофермента РНКП, т.е. образуется элонгационный комплекс кор-фермента РНКП и 6S РНК. Последующее удлинение пРНК еще на четыре н.о., по-видимому, и вызывает «переключение» конформации 6S РНК и образование удлиненной шпильки между районами CRIII и CRIV, после чего диссоциация РНКП становится возможной. Например, предварительно сформированный комплекс между 6S РНК и синтетической 14-звенной пРНК полностью теряет средство к РНКП [56]. Мутантные формы 6S РНК, не способные к образованию такой шпильки, приводят к синтезу более длинных пРНК и более позднему высвобождению кор-фермента [57]. Интересно, что у 6S РНК различные нуклеотидные замены в области –10 приводили как к уменьшению, так и к увеличению скорости диссоциации молекулы из комплекса с РНКП вследствие синтеза пРНК [49], а негативный эффект некоторых мутаций в центральной петле молекулы нивелировался заменами соседних или противостоящих н.о., подтверждая тем самым множественность контактов между 6S РНК и РНКП и их синергизм [58].

Изменение конформации 6S РНК *E. coli* с образованием длинной центральной шпильки удалось зафиксировать и в условиях *in vivo* [48]. Было показано, что активный синтез пРНК наблюдался в основном на стадии выхода клеток из стационарной фазы роста при разбавлении клеточной культуры свежей питательной средой [50]. Таким образом, РНК-зависимая

транскрипция с матрицы 6S РНК имеет важное функциональное значение. Поскольку в стационарной фазе роста клеток большая часть РНКП «хранится» в связанной с 6S РНК форме, при появлении питательных веществ необходимо быстрое и эффективное высвобождение фермента для возобновления активной транскрипции с промоторов генов. Это и достигается с помощью синтеза пРНК на матрице 6S РНК, за счет которого происходит «снятие» эффекта ингибирования, несмотря на высокую концентрацию 6S РНК в клетке. Свободный комплекс 6S РНК–пРНК больше не может связывать РНКП и, вероятно, подвергается деградации. Ферменты, участвующие в гидролизе 6S РНК и комплекса 6S РНК–пРНК, на сегодняшний день не установлены.

Транскрипция полноразмерных пРНК требует существенно более высоких концентраций NTP по сравнению с транскрипцией с промоторов генов [50] и может рассматриваться как своеобразный механизм детекции количества питательных веществ в клетке. При их дефиците возможен синтез только коротких нефункциональных пРНК (abortивных транскриптов), способных к образованию стабильного комплекса с 6S РНК и изменению конформации последней. В этом случае 6S РНК остается связанной с РНКП, и ингибирование транскрипции продолжается. Модель функционирования 6S РНК *E. coli* в клетке представлена на рис. 3. Напомним, что возрастание концентрации этой нкРНК в стационарной фазе роста клеток блокирует активность лишь основного холофермента σ^{70} -РНКП, осуществляющего транскрипцию генов домашнего хозяйства, тогда как холоферменты с альтернативными σ -факторами (специфическими для тех или иных стрессовых условий) не связывают 6S РНК и продолжают беспрепятственно функционировать.

ПОИСК 6S РНК В РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЯХ

В 2005 г. в результате сравнительного анализа последовательностей нкРНК и моделирования их вторичных структур было предсказано наличие 6S РНК более чем для 100 различных видов бактерий [19]. 6S РНК энтеробактерий обладали практически идентичными первичными структурами, однако при сравнении генов 6S РНК различных классов прокариот процент гомологии резко снижался [19, 34]. Тем не менее все обнаруженные последовательности имели самокомплементарные участки и с высокой степенью вероятности образовывали вторичную

структуру в виде двухцепочечной спирали с центральным «пузырем» по аналогии с 6S РНК *E. coli*.

В опубликованном в 2014 г. биоинформатическом исследовании идентифицировано уже 1750 потенциальных генов 6S РНК для более 1600 различных бактериальных геномов [20]. В основе поиска также лежал принцип сравнения предсказанных вторичных структур молекул с консервативной структурой 6S РНК, однако в данном случае авторы также уделяли отдельное внимание возможным изменениям конформаций 6S РНК при синтезе пРНК. Последовательности 6S РНК были обнаружены в подавляющем большинстве известных на данный момент геномов протеобактерий, фирмикутов, фузобактерий, ацидобактерий, зеленых серобактерий, гипертермофилов Aquificae и некоторых

других. Относительно меньшее количество потенциальных 6S РНК было идентифицировано среди фотосинтетических бактерий типа *Chloroflexi*, цианобактерий, спирохет, хламидий и планктомицетов. Среди 235 известных геномов актинобактерий лишь для семи представителей класса *Coriobacteriia* удалось обнаружить гены 6S РНК, хотя ранее два потенциальных кандидата 6S РНК были идентифицированы в бактериях *Mycobacterium smegmatis* [59] и *Streptomyces coelicolor* [59, 60]. Однако в первом случае предполагаемая 6S РНК не связывала основной холофермент РНКП *M. smegmatis* [59], тогда как функции 6S РНК *S. coelicolor* были подтверждены экспериментально (см. ниже) [61]. Не удалось выявить наличие гена 6S РНК для ряда экстремофилов, принадлежащих типам *Deinococcus*, *Thermus* и *Thermotogae*, ультрамикробактерий

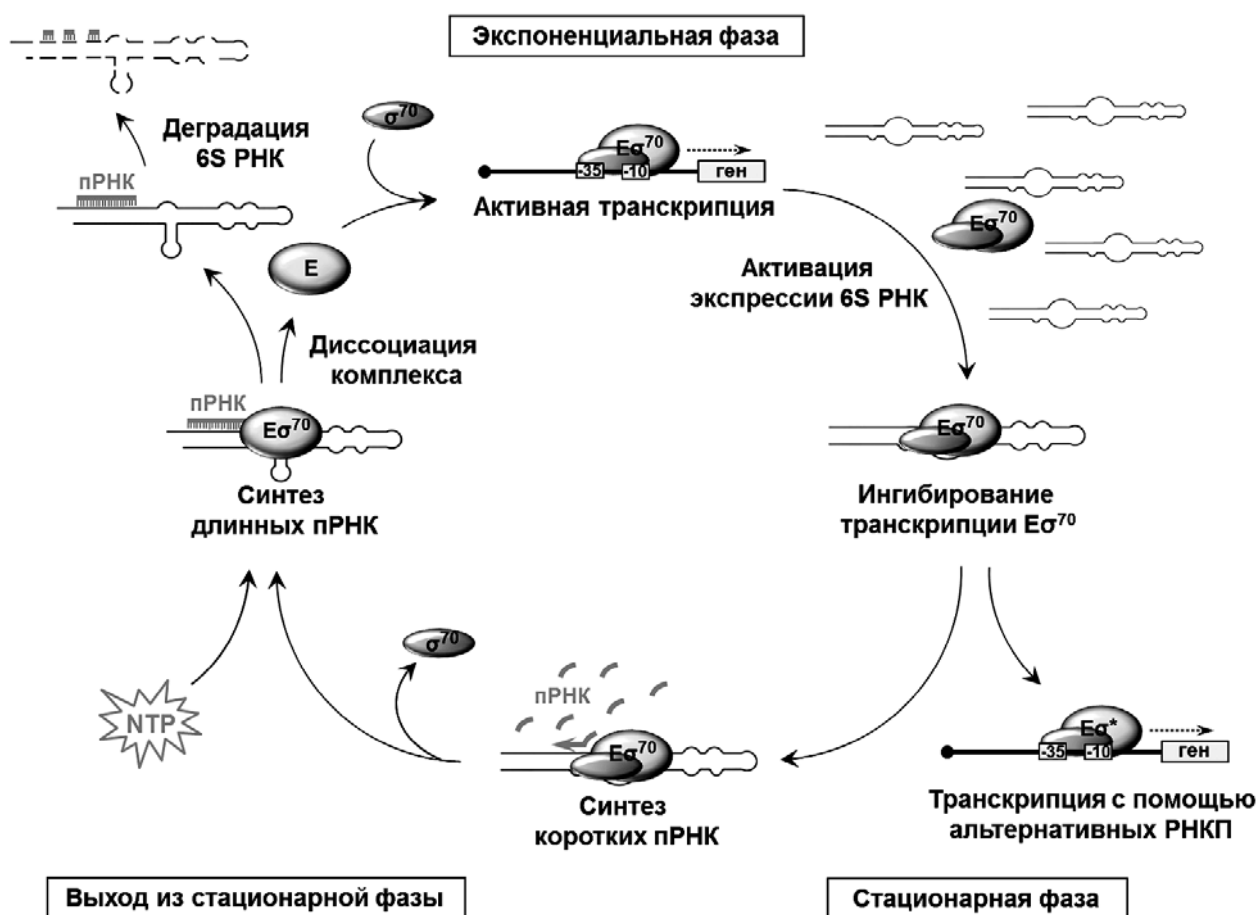


Рис. 3. Схема функционирования 6S РНК в клетках *E. coli*. Транскрипция 6S РНК-зависимых генов, осуществляемая в экспоненциальной фазе роста клеток посредством σ^{70} -РНКП, ингибируется при переходе в стационарную фазу роста в связи с возрастанием концентрации 6S РНК в клетке. В условиях недостатка питательных веществ не происходит эффективный синтез пРНК, и ингибирование транскрипции продолжается. При возобновлении активного роста клеток становится возможным синтез длинных пРНК, изменяющих конформацию 6S РНК, что приводит к ее диссоциации из комплекса с РНКП. «Освобожденный» фермент вновь продолжает транскрипцию

Elusimicrobia, а также Fibrobacteres и Tenericutes. На примере 6S РНК *S. coelicolor* очевидно, что биоинформатический поиск новых кандидатов осложнен возможными ошибками предсказания вторичных структур нкРНК. Также нельзя исключить тот факт, что для регуляции РНКП в некоторых бактериях необязательно наличие стабильной конформации 6S РНК в виде протяженной шпильки с центральным «пузырем».

Согласно биоинформатическим данным средняя длина прокариотических 6S РНК составляет 183 н.о. и варьирует от 153 н.о. в бактерии *Erysipelothrix rhusiopathiae* (принадлежащей к типу фирмикуты) до 237 н.о. в зеленой серобактерии *Pelodictyon phaeoclathratiforme* [20]. Интересно, что в некоторых бактериях было обнаружено несколько различных генов 6S РНК. Впервые дополнительный ген 6S РНК был обнаружен в 2005 г. в ряде бактерий из класса бацилл: *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Oceanobacillus iheyensis* [19, 34], *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus clausii* [34], а также в двух представителях типа фирмикутов из класса клостридий: *Clostridium acetobutylicum* и *Thermoanaerobacter tengcongensis* [19]. Экспрессия двух независимых генов *bsrA* и *bsrB* *B. subtilis* была продемонстрирована экспериментально еще в 2002 г. [62, 63], однако их аннотирование как генов 6S-1 и 6S-2 РНК соответственно было проведено позднее [19, 34]. Существование второй 6S РНК было также предсказано для неродственных фирмикутам магнитотаксисных α -протеобактерий *Magnetospirillum magnetotacticum* штамма MS-1 и *Magnetococcus* штамма MC-1. Причем в последнем случае в геноме присутствуют три копии одной из двух 6S РНК [19, 20]. Аналогичная ситуация наблюдается у бактерии *C. acetobutylicum*, содержащей в сумме три гена 6S РНК, два из которых являются идентичными, и *Bacillus anthracis*, содержащей две одинаковые 6S РНК [19].

На сегодняшний день наличие двух различных 6S РНК предсказано для 95 видов бактерий типа фирмикуты, из которых 79 относятся к семейству Bacillaceae [20]. В большинстве случаев гены 6S-1 и 6S-2 РНК находятся в различных локусах генома, за исключением геномов *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. thuringiensis* и *B. weihenstephanensis*, в которых паралоги расположены тандемно. Интересно, что один из генов 6S РНК *B. coagulans* разделен на две части, находящиеся в различных местах хромосомы. Гены трех различных 6S РНК обнаружены в *B. cellulolyticus* DSM 2522 и *B. megaterium* QM B1551, тогда как геном *Clostridium ljungdahlii* кодирует четыре различных 6S РНК. Однако мультиплетность 6S РНК не является отличительной чертой фирмикутов. Два вероятных паралога 6S РНК

обнаружены в актинобактерии *Bifidobacterium animalis lactis*, цианобактерии *Synechococcus* sp. RCC307, а также во всех секвенированных на данный момент представителях семейств Geobacteraceae и Pelobacteraceae, относящихся к δ -протеобактериям [20].

Как уже упоминалось, исторически первой из обнаруженных 6S РНК стала 6S РНК *E. coli*, а последующее выявление ее роли как ингибитора РНКП обусловило непрекращающийся интерес к исследованиям именно этой 6S РНК. Абсолютно идентичная 6S РНК была найдена в бактерии *S. dysenteriae* в 1971 г. [23]. Несмотря на меньший процент гомологии с 6S РНК *E. coli*, в работе Вассарман с соавт. [18] для установления взаимодействия с РНКП использовалась 6S РНК из неродственной *E. coli* γ -протеобактерии *Haemophilus influenzae* [64], которая, тем не менее, была способна замещать 6S РНК *E. coli* в клетках и эффективно связывать фермент. В ходе транскриптомного анализа были идентифицированы 6S РНК *Listeria monocytogenes* [65], а также 6S РНК двух азотфиксирующих бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium meliloti* [66], причем уровень экспрессии этих 6S РНК практически не изменялся при переходе клеток из экспоненциальной в стационарную фазу роста. С помощью блот-гибридизации в варианте Нозерн удалось детектировать 6S РНК в патогенных бактериях *Staphylococcus aureus* [67] и *Salmonella typhimurium* [68]. Интересно, что в последнем случае экспрессия 6S РНК возрастала при пролиферации внутриклеточного паразита в зараженных фибробластах крысы. Активация синтеза 6S РНК также наблюдалась в инфицированных патогеном *Yersinia pestis* тканях легких мыши по сравнению с культивированием бактерии в питательных средах [69] и при симбиотическом развитии бактерии *Wolbachia* sp. wOo, инфицирующей нематоды-филярии *Onchocerca ochengi* [70]. Более детальное изучение вклада 6S РНК-зависимой регуляции транскрипции в формирование вирулентности бактерии проведено для *Legionella pneumophila*, экспрессирующей две различные 6S РНК [71, 72]. Второй бактерией, для которой наличие двух 6S РНК подтверждено экспериментально, является *B. subtilis* [34, 62, 63].

ДВЕ 6S РНК *Legionella pneumophila*

6S-1 РНК из *L. pneumophila* проявляет все типичные черты 6S РНК: имеет консервативную вторичную структуру, аккумулируется в стационарной фазе роста клеток и выделяется при иммуносоосаждении с РНКП [71]. Уровень

экспрессии полноразмерной 182-звенной 6S-1 РНК не изменяется на протяжении логарифмической фазы роста клеток, однако резко возрастает при переходе в стационарную фазу. В этой фазе также наблюдается отщепление 35-звенного участка с 3'-конца молекулы, не участвующего в образовании типичной для 6S РНК вторичной структуры, поскольку его нуклеотидная последовательность идентична Rho-независимому терминатору транскрипции. По этой причине предполагается, что свойства и функции длинной (182 н.о.) и короткой (147 н.о.) форм 6S-1 РНК не различаются. Эффективность синтеза 6S-1 РНК практически не изменяется в условиях окислительного и осмотического стрессов, однако возрастает в несколько раз при инфицировании макрофагов человека по сравнению с культивированием клеток в питательной среде. Делеция гена *ssrS*, кодирующего 6S-1 РНК, в свою очередь приводит к снижению на порядок скорости деления *L. pneumophila* в клетках хозяина. В ходе сравнительного транскриптомного анализа мутантной клеточной линии и клеток дикого типа было обнаружено 127 генов, экспрессия которых уменьшалась в отсутствие 6S-1 РНК. Большинство из них кодируют мембранные белки и ферменты, ответственные за метаболизм аминокислот и углеводов, однако некоторые из идентифицированных белков вовлечены в процессы репликации и репарации ДНК, клеточную адаптацию к стрессовым условиям и формирование вакуоли, содержащей *L. pneumophila* (LCV), внутри клетки-хозяина. 6S-1 РНК-зависимая активация экспрессии этих генов в клетках дикого типа стала весьма неожиданным открытием, поскольку основная функция 6S РНК заключается в ингибировании транскрипции. Тем не менее в случае *L. pneumophila* экспрессия лишь восьми генов (четыре из которых участвуют в метаболизме аминокислот) возрастала в отсутствие 6S-1 РНК [71].

Обнаружение в клетках *L. pneumophila* второй 6S РНК длиной ~150 н.о., экспрессирующейся в десятки раз эффективнее, чем 6S-1 РНК, также привело к возникновению множества вопросов. Максимум экспрессии 6S-2 РНК наблюдался при культивировании *L. pneumophila* в питательной среде вне зависимости от фазы роста клеток. При инфицировании протистов *Acanthamoeba castellanii* относительная концентрация 6S-2 РНК была в ~4 раза ниже и лишь незначительно возрастала при переходе в стационарную фазу роста клеток. Кроме того, ген 6S-2 РНК транскрибировался и с антисмысловой цепи (преимущественно в экспоненциальной фазе роста клеток) с образованием 175-звенного продукта [72]. Эффективность такой транскрипции сравни-

тельно мала, однако, принимая во внимание палиндромную частично самокомплементарную организацию любой 6S РНК, можно предположить, что данный транскрипт тоже связывает РНКП. Согласно данным биоинформатического анализа дивергентное расположение двух генов 6S РНК в одном локусе генома, которое должно приводить к существованию смыслового и антисмыслового транскриптов, характерно для рода *Marinobacter*, также принадлежащего к типу γ -протеобактерий [20]. Свойства и конкретные функции обоих вариантов 6S-2 РНК на сегодняшний день неизвестны, однако предполагается, что они также участвуют в патогенезе *L. pneumophila*.

ДВЕ 6S РНК *Bacillus subtilis*

Впервые 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* были охарактеризованы в 2005 г.: обе молекулы выделялись при иммуноосаждении с основным холоферментом РНКП *B. subtilis*, содержащем в своем составе σ^A -субъединицу (ортолог σ^{70} -фактора *E. coli*) [34]. 6S-1 РНК транскрибировалась в виде 201-звенного предшественника, подвергающегося частичному 5'-процессингу с образованием зрелой формы длиной 190 н.о., тогда как для 6S-2 РНК детектировался только один вариант длиной 203 н.о. Характерная вторичная структура 6S-1 РНК, определенная методом ферментативного «пробинга» [19], а также ее аккумулялирование в стационарной фазе роста клеток свидетельствовали о том, что она является гомологом 6S РНК *E. coli* [19, 34]. В то же время необычный профиль экспрессии 6S-2 РНК, максимум синтеза которой наблюдался в средней логарифмической фазе (в стационарной фазе эта РНК практически отсутствовала) [19, 73], а также менее стабильная конформация молекулы привели к возникновению различных гипотез относительно ее функций в клетке [56].

В 2011 г. было показано, что σ^A -РНКП *B. subtilis* в условиях *in vitro* способна синтезировать короткие транскрипты как с 6S-1, так и с 6S-2 РНК с одинаковой эффективностью [73]. Поскольку последовательность пРНК_{6S-2} содержит большее количество остатков А и У по сравнению с пРНК_{6S-1}, основные продукты транскрипции с 6S-2 РНК длиной 15–16 н.о. неспособны образовывать достаточно стабильный комплекс с матрицей и приводить к диссоциации РНКП. Синтез функциональных пРНК_{6S-2} длиной более 20 н.о. малоэффективен, и его значение в условиях *in vivo* остается под вопросом [74]. В то же время синтез 14-звенных пРНК_{6S-1} приводит к ярко выраженным структурным изменениям

6S-1 РНК. Однако вместо образования протяженной шпильки, имеющей место в случае 6S РНК *E. coli*, «нижняя» часть центральной петли 6S-1 РНК *B. subtilis* образует РНК-дуплекс с гексануклеотидом, расположенным в «верхней» части молекулы, что приводит к «коллапсу» аналога транскрипционного «пузыря» 6S-1 РНК и потере сродства к РНКП [75].

Несмотря на некоторые механистические отличия в синтезе и, возможно, функционировании пРНК_{6S-1} и пРНК_{6S-2}, обе 6S РНК *B. subtilis* проявляют все характерные черты 6S РНК, одинаково эффективно ингибируют транскрипцию *in vitro* с модельных промоторов ДНК и характеризуются сравнимым сродством к холоферменту РНКП [74]. Влияние 6S-1 и 6S-2 РНК на экспрессию генов в условиях *in vivo* было продемонстрировано с помощью сравнительного протеомного анализа клеток дикого типа и делеционных производных, лишенных 6S-1 ($\Delta bsrA$), 6S-2 ($\Delta bsrB$) или обеих 6S РНК ($\Delta bsrAB$). Отсутствие каждой из 6S РНК приводило к возрастанию уровня экспрессии большого количества белков, в т.ч. участвующих в клеточном ответе на стрессовые условия. Ингибирующий эффект 6S-2 РНК был наиболее ярко выражен в экспоненциальной фазе роста клеток, что коррелирует с профилем экспрессии этой нкРНК, однако проявлялся и в ранней стационарной фазе наравне с 6S-1 РНК-зависимым ингибированием. Интересно, что экспрессия 11 из 35 идентифицированных белков, синтез которых ингибировался с помощью обеих 6S РНК, по всей видимости, также регулируется с помощью фактора катаболической репрессии CsrA. Участие еще трех белков в клеточном метаболизме углерода также указывает на связь этих двух процессов [76].

Делеции генов *bsrA* и *bsrB* также приводили к проявлению фенотипов мутантных штаммов в поздней стационарной фазе роста, выражающихся в понижении оптической плотности клеточной культуры после 24 ч выращивания. Наиболее ярко данный фенотип проявлялся для штамма с делецией обоих генов и менее выражено — для нокаута $\Delta bsrA$. Обратный эффект наблюдался при pH 9,82: клеточная линия $\Delta bsrAB$ быстрее адаптировалась к условиям щелочного стресса, меньший эффект был замечен для делеции гена 6S-1 РНК. Подобный фенотип штамма $\Delta sssS$ был обнаружен ранее в системе *E. coli* (см. выше) [41]. Делеция гена *bsrB* в обоих случаях приводила лишь к незначительным изменениям клеточного роста. Тем не менее аддитивность эффектов 6S-1 и 6S-2 РНК, наблюдаемая для клеток $\Delta bsrAB$, свидетельствует о важности каждой из РНК для жизнедеятельности бактерии

[76]. Еще один фенотип клеток с делецией гена 6S-1 РНК был обнаружен на стадии выхода из стационарной фазы и выражался в замедлении экспоненциального роста культуры по сравнению с другими клеточными линиями, в т.ч. с нокаутами $\Delta bsrB$ и $\Delta bsrAB$. Поскольку замена 6S-2 РНК на ее нефункциональный аналог с удаленным центральным «пузырем» привела к исчезновению выявленного фенотипа, авторами был сделан вывод, что наблюдаемый эффект нокаута гена *bsrA* связан именно с наличием 6S-2 РНК в отсутствие 6S-1 РНК [56]. Т.к. эффективность синтеза функциональных пРНК_{6S-2} (>20 н.о.) в условиях *in vivo* неизвестна, можно предположить, что процесс «отмены» ингибирования РНКП с помощью 6S-2 РНК занимает более длительное время и требует высокой концентрации АТФ или участия дополнительных факторов. Однако не все эффекты делеций связаны с этим свойством 6S-2 РНК. Помимо описанного выше, делеция гена *bsrA*, так же как и делеция обоих генов 6S РНК, например, приводила к более ранней споруляции *B. subtilis* вследствие быстрого расхода питательных веществ [77]. Эти и другие данные свидетельствуют о разной роли 6S-1 и 6S-2 РНК в регуляции механизмов жизнедеятельности клетки, но в целом подтверждают их функцию регуляторов экспрессии генов.

6S РНК ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Среда обитания и процессы жизнедеятельности цианобактерий (сине-зеленых водорослей) кардинально отличаются от таковых для протеобактерий и фирмикутов. Тем не менее для четырех неродственных видов этих бактерий — *Synechocystis* sp. PCC6803, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Synechococcus elongatus* PCC7942 и *Nostoc* sp. PCC7120 — имеются экспериментальные свидетельства экспрессии и функционирования 6S РНК, отличающиеся от общепринятой модели *E. coli*. Так, например, уровень экспрессии 6S РНК *Synechococcus* максимален в экспоненциальной фазе роста [78], а синтез 6S РНК *Prochlorococcus marinus* зависит от времени суток и достигает максимума в дневное время. В последнем случае транскрипция гена 6S РНК может осуществляться как с собственного промотора с образованием 220-звенного продукта, так и вместе с предстоящим геном *purK*, кодирующим фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазу. Более протяженный транскрипт подвергается процессингу с образованием 332-звенной 6S РНК. Экспрессия двух вариантов 6S РНК *Prochlorococcus marinus* зависит от стадии клеточного роста: короткий транскрипт превалирует в клеточных куль-

турах с повышенной плотностью, а более длинный имеет два максимума экспрессии — в конце лаг-фазы и во время перехода клеток в стационарную фазу роста. Изменение абсолютных значений концентраций 6S РНК в обоих случаях не превышало 3–5 раз [79].

6S РНК всех четырех изученных бактерий эффективно связывали холофермент σ^{70} -РНКП *E. coli* и ингибировали транскрипцию с модельных промоторов *E. coli in vitro* [80]. Кроме того, во всех случаях в присутствии NTP наблюдался синтез пРНК длиной ~10–30 н.о. и более. Это согласовалось с данными транскриптомного анализа *Synechocystis* sp. PCC6803, в ходе которого удалось идентифицировать пРНК-транскрипты длиной ~30 н.о. [81]. Определенный интерес представляет установление стехиометрии комплекса РНКП с длинным вариантом 6S РНК из *Prochlorococcus marinus*, поскольку дополнительные 132 н.о. с 5'-конца молекулы предположительно образуют еще один 6S РНК-подобный структурный элемент в виде шпильки с расплетенной центральной частью [79].

Делеция гена *ssaA*, кодирующего 6S РНК из *Synechocystis* sp. PCC6803, не влияла на скорость роста клеток при культивировании в жидких питательных средах, однако приводила к снижению жизнеспособности мутантного штамма при выращивании на твердых средах. Наблюдаемое отличие, вероятно, связано с чувствительностью делеционной клеточной линии к свету [80].

6S РНК *Aquifex aeolicus* И *Helicobacter pylori*

Впервые 6S РНК экстремофила *A. aeolicus* была обнаружена в ходе транскриптомного анализа [82]. Малая длина молекулы (163 н.о.) и вместе с тем наиболее высокая стабильность вторичной структуры по сравнению с известными 6S РНК обусловили стремление ученых к определению ее структуры методом рентгеноструктурного анализа. Предпринятые попытки не увенчались успехом, поскольку 6S РНК *A. aeolicus* деградировала непосредственно в кристаллизационной ячейке. Единственный фрагмент, для которого были получены рентгеноструктурные данные, представлял собой 12-звенный дуплекс в 5'/3'-концевой области молекулы [83]. Лучших результатов удалось добиться при использовании метода ЯМР и структурного «пробинга» молекулы, в т.ч. и в комплексе с синтезирующейся на ее матрице пРНК длиной 9–17 н.о. [84]. Как было установлено, РНК-зависимая транскрипция на матрице 6S РНК *A. aeolicus* приводит не только к формированию протяжен-

ной шпильки в 3'-концевой части центральной петли (по аналогии с конформационными изменениями 6S РНК *E. coli* [48]), но и к образованию короткого двухцепочечного участка, приводящего к «коллапсу» центрального «пузыря» (характерного для 6S РНК *B. subtilis* [75]), объединяя тем самым два различных механизма диссоциации 6S РНК из комплекса с РНКП. Синтез пРНК на матрице 6S РНК *A. aeolicus* был продемонстрирован в условиях *in vitro* при использовании σ^A -РНКП *B. subtilis*, а также при обработке данных транскриптомного анализа, согласно которым помимо основной стартовой точки транскрипции пРНК — С48 и соседней с ней С50 возможен менее эффективный синтез альтернативных пРНК с противоположной стороны центральной петли (ТСС С110 и С112). Подобный случай уже был описан ранее для 180-звенной 6S РНК *H. pylori*, для которой был зафиксирован примерно одинаковый по эффективности синтез как «канонических» ~12-звенных пРНК с 5'-концевой стороны центрального «пузыря», так и альтернативных пРНК длиной до 17 н.о. с противоположной стороны молекулы [85]. Незначительный синтез таких пРНК детектируется и при более детальном анализе транскриптомов *L. monocytogenes*, *B. subtilis* и даже *E. coli* [20] и, видимо, связан с симметричным строением самих 6S РНК. Пока неясно, является ли этот процесс функционально значимым и влияет ли он на конформацию 6S РНК.

6S РНК *Streptomyces coelicolor*

S. coelicolor — почвенная бактерия, известная как продуцент различных антибиотиков, в т.ч. актинородина. 6S РНК *S. coelicolor* аккумулируется в стационарной фазе роста клеток и по данным ферментативного «пробинга» образует типичную для 6S РНК γ -протеобактерий вторичную структуру [61]. Было показано, что 6S РНК может связывать холофермент РНКП *S. coelicolor*, содержащий один из основных σ -факторов Hrd^B. Согласно результатам УФ-кросслинкинга 6S РНК образует контакты не только с Hrd^B, но и с β -, β' - и ω -субъединицами РНКП. В условиях комплексообразования 6S РНК с Hrd^B-РНКП *in vitro* в присутствии NTP наблюдался синтез пРНК длиной до 20 н.о., остающихся связанными с 6S РНК, что приводило к диссоциации фермента. Таким образом, 6S РНК *S. coelicolor* проявляла все характерные черты 6S РНК *E. coli*. Мутантный штамм *S. coelicolor* с делецией гена 6S РНК характеризовался более низкой жизнеспособностью клеток в поздней стационарной фазе роста по сравнению с клетками дикого ти-

Имеющиеся экспериментальные данные о 6S РНК из различных бактерий

Класс	Вид	Длина, н.о.*	Экспрессия в клетке (метод детекции, фаза роста/условия)	Образование комплекса с РНКП (метод детекции)	Синтез пРНК (TSS, длина продуктов, н.о.)
1	2	3	4	5	6
Протеобактерии					
α-Протеобактерии	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> [66]	~200	NB, незначит. изм.	–	–
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> [66]	~200	NB, без изм.	–	–
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> [86]	~160	RNAseq, NB	–	–
	<i>Wolbachia</i> sp. wOo [70]	~200	RNAseq	–	–
β-Протеобактерии	<i>Burkholderia cenocepacia</i> [87]	~180	МА, qRT-PCR, окислит. стресс	–	–
γ-Протеобактерии	<i>Escherichia coli</i> [22, 23]	184	PAGE, NB, стац.	+ (IP, CF)	U44, 20–24 н.о. (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)
	<i>Haemophilus influenzae</i> [18, 64]	198	–	+ (IP, CF)	–
	<i>Legionella pneumophila</i> 6S-1 РНК [71]	147 (182)	NB, стац. внутрикл.	–	–
	<i>Legionella pneumophila</i> 6S-2 РНК** [72]	150 (+) 175 (–)	RNASeq, незначит. изм.	–	–
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [27]	185	PAGE, стац.	–	–
	<i>Salmonella enterica</i> [68]	182	NB, без изм.	–	–
	<i>Shigella dysenteriae</i> [23]	184	PAGE, стац.	–	–
	<i>Yersinia pestis</i> [69]	184	RNAseq, внутрикл.	–	–
	ε-Протеобактерия	<i>Helicobacter pylori</i> [85]	~180	NB, без изменений	–
Фирмикуты					
Бациллы	<i>Bacillus subtilis</i> 6S-1 РНК [34, 62]	190 (201)	NB, стац.	+ (IP, CF)	C45, 8–14 н.о. (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)
	<i>Bacillus subtilis</i> 6S-2 РНК [34, 63]	203	NB, эксп.	+ (IP, CF)	U43, 15–16, >20 н.о. (<i>in vitro</i>)
	<i>Listeria monocytogenes</i> [65]	180	NB, незначит. изм.	–	–
Клостридии	<i>Clostridium acetobutylicum</i> [88]	256	NB, бутиратный стресс	–	–
Кокки	<i>Staphylococcus aureus</i> [67, 89]	144 (230)	RNAseq, NB	–	–

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6
Цианобактерии					
	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 [80]	187	NB	+ (CF)	U44, 15–30 н.о (<i>in vitro</i>)
	<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4 [79]	220 (333)	NB, суточные колебания	+ (CF)	TSS неизвестна, ≤25 н.о (<i>in vitro</i>)
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 [78, 80]	185	NB	+ (CF)	U47, 15–30 н.о (<i>in vitro</i>)
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 [80, 81]	189	NB, эксп.	+ (CF)	U47, 15–30 н.о. (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)
Aquificae					
Aquificae	<i>Aquifex aeolicus</i> [82, 84]	163	NB, стац.	+ (CF)	C48 (C50, C110), 9–17 н.о. (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)
	<i>Sulfurihydrogenibium</i> sp. YO3AOP1 [20]	189	NB	–	–
Актинобактерии					
Actinomycetales	<i>Streptomyces coelicolor</i> [61]	192	NB, стац.	+ (IP, CF)	TSS неизвестна, 4–20 н.о. (<i>in vitro</i>)
Chloroflexi					
Chloroflexi	<i>Roseiflexus castenholzii</i> [20]	173	NB	–	–

Условные обозначения: MA – «microarray», транскриптомный анализ с использованием технологии ДНК-микрочипов; NB – блот-гибридизация в варианте Нозерн; PAGE – гель-электрофорез в ПААГ; RNASeq – транскриптомный анализ (полногеномное секвенирование); qRT-PCR – количественная ПЦР с обратной транскрипцией; IP – иммуноосаждение с РНКП; CF – комплексообразование *in vitro*; «–» – нет данных. Также указаны условия активации экспрессии 6S РНК (если имеются данные) в определенной фазе роста клеток (эксп. – экспоненциальная, стац. – стационарная), в ответ на смену дня/ночи (суточные колебания), при клеточном ответе на стресс (бутиратный, окислит. – окислительный) и внутриклеточном развитии патогенных бактерий (внутрикл.) или отсутствие таковых (незначит. изм./без изменений).

* Длина предшествующих 6S РНК, подвергающихся последующему процессингу, указана в скобках.

** 6S-2 РНК *L. pneumophila* синтезируется как со смысловой (+), так и с антисмысловой (–) цепей гена.

па, изменением морфологии мицелия, а также существенным уменьшением содержания актинородина. Было обнаружено, что 6S РНК активирует экспрессию оперона *actII-ORF4*, ответственного за регуляцию процессов синтеза антибиотика. Одним из возможных объяснений является 6S РНК-зависимое ингибирование экспрессии ppGpp-синтазы RelA, приводящее к снижению концентрации алармона в клетке и, как следствие, отсутствию ppGpp-опосредованной регуляции экспрессии различных генов. Последовательности, гомологичные 6S РНК *S. coelicolor*, также обнаружены в родственных бактериях *S. griseus*, *S. avermitilis* и *S. cyaneus* [61], продуцирующих различные антибиотики, что

не исключает потенциальной возможности использования 6S РНК-зависимой активации экспрессии генов в прикладных целях.

6S РНК, несомненно, являются важнейшим элементом контроля активности РНКП. Тем не менее экспериментальные свидетельства экспрессии 6S РНК и/или их функционирования как регуляторов транскрипции существуют лишь для двух десятков видов бактерий (таблица), причем практически все ключевые исследования механизма действия 6S РНК выполнены в системах *E. coli* и *B. subtilis*. Многие 6S РНК детектируются в ходе транскриптомного анализа, но практически ничего не известно об их функ-

циях в клетке. Единичные эксперименты демонстрируют очевидные отличия функционирования 6S РНК различных бактерий от 6S РНК *E. coli*, обусловленные в первую очередь глобальным разнообразием условий обитания и процессов жизнедеятельности прокариот. Дальнейшие исследования позволяют глубже понять истинные

механизмы действия данных нкРНК и, возможно, выявить общие закономерности 6S РНК-зависимой регуляции экспрессии генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-24-00061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li, L., Huang, D., Cheung, M.K., Nong, W., Huang, Q., and Kwan, H.S. (2013) BSRD: a repository for bacterial small regulatory RNA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 233–238.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria, *Cell*, **136**, 615–628.
- Repoila, F., and Darfeuille, F. (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects, *Biol. Cell*, **101**, 117–131.
- Gottesman, S. (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria, *Trends Genet.*, **21**, 399–404.
- Storz, G., Vogel, J., and Wassarman, K.M. (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers, *Mol. Cell*, **43**, 880–891.
- Wang, L., Wang, W., Li, F., Zhang, J., Wu, J., Gong, Q., and Shi, Y. (2015) Structural insights into the recognition of the internal A-rich linker from OxyS sRNA by *Escherichia coli* Hfq, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2400–2411.
- McCullen, C.A., Benhammou, J.N., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects *rpoS* mRNA from degradation, *J. Bacteriol.*, **192**, 5559–5571.
- Masse, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4620–4625.
- Gottesman, S., and Storz, G. (2015) RNA reflections: converging on Hfq, *RNA*, **21**, 511–512.
- Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J., and Steenackers, H.P. (2015) RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria, *Front. Microbiol.*, **6**, 141.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins, *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 156–163.
- Song, C., van der Voort, M., van de Mortel, J., Hassan, K.A., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., Loper, J.E., and Raaijmakers, J.M. (2015) The Rsm regulon of plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SS101: role of small RNAs in regulation of lipopeptide biosynthesis, *Microb. Biotechnol.*, **8**, 296–310.
- Sahr, T., Bruggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*, *Mol. Microbiol.*, **72**, 741–762.
- Brantl, S. (2010) in *The chemical biology of nucleic acids* (Mayer, G., ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 199–222.
- Gaimster, H., and Summers, D. (2015) Plasmids in the driving seat: the regulatory RNA Rcd gives plasmid ColE1 control over division and growth of its *E. coli* host, *Plasmid*, **78**, 59–64.
- Blower, T.R., Pei, X.Y., Short, F.L., Fineran, P.C., Humphreys, D.P., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2011) A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **8**, 185–190.
- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2013) Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 241–249.
- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity, *Cell*, **101**, 613–623.
- Barrick, J.E., Sudarsan, N., Weinberg Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2005) 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter, *RNA*, **11**, 774–784.
- Wehner, S., Damm, K., Hartmann, R.K., and Marz, M. (2014) Dissemination of 6S RNA among bacteria, *RNA Biol.*, **11**, 1467–1478.
- Walters, R.D., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2009) InvAluable junk: the cellular impact and function of Alu and B2 RNAs, *IUBMB Life*, **61**, 831–837.
- Hindley, J. (1967) Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting, *J. Mol. Biol.*, **30**, 125–136.
- Brownlee, G.G. (1971) Sequence of 6S RNA of *E. coli*, *Nat. New Biol.*, **229**, 147–149.
- Hsu, L.M., Zagorski, J., Wang, Z., and Fournier, M.J. (1985) *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit, *J. Bacteriol.*, **161**, 1162–1170.
- Pene, J.J., Knight, E., and Darnell, J.E. (1968) Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **33**, 609–623.
- Lee, C.A., Fournier, M.J., and Beckwith, J. (1985) *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion, *J. Bacteriol.*, **161**, 1156–1161.
- Vogel, D.W., Hartmann, R.K., Struck, J.C.R., Ulbrich, N., and Erdmann, V.A. (1987) The sequence of the 6S RNA gene of *Pseudomonas aeruginosa*, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4583–4591.
- Wassarman, K.M., Zhang, A., and Storz, G. (1999) Small RNAs in *Escherichia coli*, *Trends Microbiol.*, **7**, 37–45.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA, *Science*, **271**, 990–993.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, **35**, 849–857.
- Bouche, F., and Bouche, J.P. (1989) Genetic evidence that DicF, a second division inhibitor encoded by the *Escherichia coli* *dicB* operon, is probably RNA, *Mol. Microbiol.*, **3**, 991–994.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 499–518.
- Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007) Studies on the function of the riboregulator 6S RNA

- from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1885–1896.
34. Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 313–319.
 35. Cavanagh, A.T., Klocko, A.D., Liu, X., and Wassarman, K.M. (2008) Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of σ^{70} , *Mol. Microbiol.*, **67**, 1242–1256.
 36. Klocko, A.D., and Wassarman, K.M. (2009) 6S RNA binding to $E\sigma^{70}$ requires a positively charged surface of σ^{70} region 4.2., *Mol. Microbiol.*, **73**, 152–164.
 37. Steuten, B., Setny, P., Zacharias, M., and Wagner, R. (2013) Mapping the spatial neighborhood of the regulatory 6S RNA bound to *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme, *J. Mol. Biol.*, **425**, 3649–3661.
 38. Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2004) 6S RNA function enhances long-term cell survival, *J. Bacteriol.*, **186**, 4978–4985.
 39. Neusser, T., Polen, T., Geissen, R., and Wagner, R. (2010) Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery, *BMC Genomics*, **11**, 165–179.
 40. Cavanagh, A.T., Chandrangsu, P., and Wassarman, K.M. (2010) 6S RNA regulation of *relA* alters ppGpp levels in early stationary phase, *Microbiology*, **156**, 3791–3800.
 41. Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2006) 6S RNA regulation of *pspF* transcription leads to altered cell survival at high pH, *J. Bacteriol.*, **188**, 3936–3943.
 42. Kim, K., and Lee, Y. (2004) Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 6057–6068.
 43. Jeanguenin, L., Lara-Nunez, A., Pribat, A., Mageroy, M.H., Gregory, J.F., 3rd, Rice, K.C., de Crecy-Lagard, V., and Hanson, A.D. (2010) Moonlighting glutamate formiminotransferases can functionally replace 5-formyltetrahydrofolate cycloligase, *J. Biol. Chem.*, **285**, 41557–41566.
 44. Chae, H., Han, K., Kim, K., Park, H., Lee, J., and Lee, Y. (2011) Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream *ygfA* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase), *J. Biol. Chem.*, **286**, 114–122.
 45. Lee, J.Y., Park, H., Bak, G., Kim, K.S., and Lee, Y. (2013) Regulation of transcription from two *ssrS* promoters in 6S RNA biogenesis, *Mol. Cells*, **36**, 227–234.
 46. Neusser, T., Gildehaus, N., Wurm, R., and Wagner, R. (2008) Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators important for stress and growth adaptation, *Biol. Chem.*, **389**, 285–297.
 47. Brown, J.W., and Ellis, J.C. (2005) in *Handbook of RNA biochemistry* (Hartmann, R.K., ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 490–512.
 48. Steuten, B., and Wagner, R. (2012) A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in *Escherichia coli*, *Biol. Chem.*, **393**, 1513–1522.
 49. Shephard, L., Dobson, N., and Unrau, P.J. (2010) Binding and release of the 6S transcriptional control RNA, *RNA*, **16**, 885–892.
 50. Wassarman, K.M., and Saecker, R.M. (2006) Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase, *Science*, **314**, 1601–1603.
 51. Biebricher, C.K., and Orgel, L.E. (1973) An RNA that multiplies indefinitely with DNA-dependent RNA polymerase: selection from a random copolymer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 934–938.
 52. Konarska, M.M., and Sharp, P.A. (1990) Structure of RNAs replicated by the DNA-dependent T7 RNA polymerase, *Cell*, **63**, 609–618.
 53. Leary, S.L., Baum, H.J., and Loewy, Z.G. (1991) DNA-dependent RNA polymerase from bacteriophage T3 transcribes and amplifies an RNA template *in vitro*, *Gene*, **106**, 93–96.
 54. Wurm, R., Neusser, T., and Wagner, R. (2010) 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small *de novo* products, *Biol. Chem.*, **391**, 187–196.
 55. Wade, J.T., and Struhl, K. (2008) The transition from transcriptional initiation to elongation, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 130–136.
 56. Cavanagh, A.T., Sperger, J.M., and Wassarman, K.M. (2012) Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2234–2246.
 57. Panchapakesan, S.S., and Unrau, P.J. (2012) *E. coli* 6S RNA release from RNA polymerase requires σ^{70} ejection by scrunching and is orchestrated by a conserved RNA hairpin, *RNA*, **18**, 2251–2259.
 58. Oviedo Ovando, M., Shephard, L., and Unrau, P.J. (2014) *In vitro* characterization of 6S RNA release-defective mutants uncovers features of pRNA-dependent release from RNA polymerase in *E. coli*, *RNA*, **20**, 670–680.
 59. Panek, J., Krasny, L., Bobek, J., Jezkova, E., Korelusova, J., and Vohradsky, J. (2011) The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3418–3426.
 60. Vockenhuber, M.-P., Sharma, C.M., Statt, M.G., Schmidt, D., Xu, Z., Dietrich, S., Liesegang, H., Mathews, D.H., and Suess, B. (2011) Deep sequencing-based identification of small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*, *RNA Biol.*, **8**, 468–477.
 61. Mikulik, K., Bobek, J., Zidkova, J., and Felsberg, J. (2014) 6S RNA modulates growth and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 7185–7197.
 62. Suzuma, S., Asari, S., Bunai, K., Yoshino, K., Ando, Y., Kakeshita, H., Fujita, M., Nakamura, K., and Yamane, K. (2002) Identification and characterization of novel small RNAs in the *asps-yrvM* intergenic region of the *Bacillus subtilis* genome, *Microbiology*, **148**, 2591–2598.
 63. Ando, Y., Asari, S., Suzuma, S., Yamane, K., and Nakamura, K. (2002) Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the *yocI-yocJ* intergenic region of *Bacillus subtilis* genome, *FEMS Microbiol. Lett.*, **207**, 29–33.
 64. Brosius, J. (1996) More *Haemophilus* and *Mycoplasma* genes, *Science*, **271**, 1302.
 65. Mandin, P., Repoila, F., Vergassola, M., Geissmann, T., and Cossart, P. (2007) Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 962–974.
 66. Voss, B., Holscher, M., Baumgarth, B., Kalbfleisch, A., Kaya, C., Hess, W.R., Becker, A., and Evguenieva-Hackenberg, E. (2009) Expression of small RNAs in *Rhizobiales* and protection of a small RNA and its degradation products by Hfq in *Sinorhizobium meliloti*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 331–336.
 67. Lioliou, E., Sharma, C.M., Caldelari, I., Helfer, A.-C., Fechter, P., Vandenesch, F., Vogel, J., and Romby, P. (2012) Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression, *PLoS One*, **8**, e1002782.
 68. Ortega, A.D., Gonzalo-Asensio, J., and Garcia-del Portillo, F. (2012) Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells, *RNA Biol.*, **9**, 469–488.

69. Yan, Y., Su, S., Meng, X., Ji, X., Qu, Y., Liu, Z., Wang, X., Cui, Y., Deng, Z., Zhou, D., Jiang, W., Yang, R., and Han, Y. (2013) Determination of sRNA expressions by RNA-seq in *Yersinia pestis* grown *in vitro* and during infection, *PLoS One*, **8**, e74495.
70. Darby, A.C., Christina Gill, A., Armstrong, S.D., Hartley, C.S., Xia, D., Wastling, J.M., and Makepeace, B.L. (2014) Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the global response of *Wolbachia* to doxycycline-induced stress, *ISME J.*, **8**, 925–937.
71. Weissenmayer, B.A., Prendergast, J.G., Lohan, A.J., and Loftus, B.J. (2011) Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs, *PLoS One*, **6**, e17570.
72. Faucher, S.P., Friedlander, G., Livny, J., Margalit, H., and Shuman, H.A. (2010) *Legionella pneumophila* 6S RNA optimizes intracellular multiplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7533–7538.
73. Beckmann, B.M., Burenina, O.Y., Hoch, P.G., Kubareva, E.A., Sharma, C.M., and Hartmann, R.K. (2011) *In vivo* and *in vitro* analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*, *RNA Biol.*, **8**, 839–849.
74. Burenina, O.Y., Hoch, P.G., Damm, K., Salas, M., Zatsepin, T.S., Lechner, M., Oretskaya, T.S., Kubareva, E.A., and Hartmann, R.K. (2014) Mechanistic comparison of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNA – commonalities and differences, *RNA*, **20**, 348–359.
75. Beckmann, B.M., Hoch, P.G., Marz, M., Willkomm, D.K., Salas, M., and Hartmann, R.K. (2012) A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*, *EMBO J.*, **31**, 1727–1738.
76. Hoch, P.G., Burenina, O.Y., Weber, M.H., Elkina, D.A., Nesterchuk, M.V., Sergiev, P.V., Hartmann, R.K., and Kubareva, E.A. (2015) Phenotypic characterization and complementation analysis of *Bacillus subtilis* 6S RNA single and double deletion mutants, *Biochimie*, pii: S0300-9084(15)00002-4.
77. Cavanagh, A.T., and Wassarman, K.M. (2013) 6S-1 RNA function leads to a delay in sporulation in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **195**, 2079–2086.
78. Watanabe, T., Sugiura, M., and Sugita, M. (1997) A novel small stable RNA, 6Sa RNA, from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301, *FEBS Lett.*, **416**, 302–306.
79. Axmann, I.M., Holtzendorff, J., Voss, B., Kensche, P., and Hess, W.R. (2007) Two distinct types of 6S RNA in *Prochlorococcus*, *Gene*, **406**, 69–78.
80. Rediger, A., Geissen, R., Steuten, B., Heilmann, B., Wagner, R., and Axmann, I.M. (2012) 6S RNA – an old issue became blue-green, *Microbiol.*, **158**, 2480–2491.
81. Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C.M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voss, B., Steglich, C., Wilde, A., Vogel, J., and Hess, W.R. (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2124–2129.
82. Willkomm, D.K., Minnerup, J., Huttenhofer, A., and Hartmann, R.K. (2005) Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1949–1960.
83. Kondo, J., Dock-Bregeon, A.-C., Willkomm, D.K., Hartmann, R.K., and Westhof, E. (2013) Structure of an A-form RNA duplex obtained by degradation of 6S RNA in a crystallization droplet, *Acta Crystallogr.*, **69**, 634–639.
84. Kohler, K., Duchardt-Ferner, E., Lechner, M., Damm, K., Hoch, P.G., Salas, M., and Hartmann, R.K. (2015) Structural and mechanistic characterization of 6S RNA from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Biochimie*, pii: S0300-9084(15)00063-2.
85. Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermuller, J., Reinhardt, R., Stadler, P.F., and Vogel, J. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature*, **464**, 250–255.
86. Berghoff, B.A., Glaeser, J., Sharma, C.M., Vogel, J., and Klug, G. (2009) Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*, *Mol. Microbiol.*, **74**, 1497–1512.
87. Peeters, E., Sass, A., Mahenthalingam, E., Nelis, H., and Coenye, T. (2010) Transcriptional response of *Burkholderia cenocepacia* J2315 sessile cells to treatments with high doses of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, *BMC Genomics*, **11**, 90.
88. Venkataramanan, K.P., Jones, S.W., McCormick, K.P., Kunjeti, S.G., Ralston, M.T., Meyers, B.C., and Papoutsakis, E.T. (2013) The *Clostridium* small RNome that responds to stress: the paradigm and importance of toxic metabolite stress in *C. acetobutylicum*, *BMC Genomics*, **14**, 849.
89. Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, C.M., Marchais, A., Skorski, P., Borezee-Durant, E., Barbet, R., Jacquet, E., Jacq, A., Gautheret, D., Felden, B., Vogel, J., and Boulloc, P. (2010). Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6620–6636.

**SMALL NONCODING 6S RNAs
IN BACTERIA****O. Y. Burenina¹, D. A. Elkina¹, R. K. Hartmann²,
T. S. Oretskaya¹, E. A. Kubareva^{3*}**¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)932-8846*² *Institut fuer Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universitaet Marburg,
Marbacher Weg 6, D-35037 Marburg, Germany; fax: +49(6421)28-25854,
E-mail: roland.hartmann@staff.uni-marburg.de*³ *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-3138,
E-mail: kubareva@belozersky.msu.ru*

Received July 2, 2015

Revision received July 21, 2015

Small noncoding RNAs are non-translated transcripts with length below ~300 nucleotides. A variety of cellular processes is known to be regulated by such ncRNAs in eukaryotes, but numerous ncRNAs are present in bacteria as well. One of the most famous small bacterial ncRNAs is 6S RNA, which is widespread across all branches of Bacteria. 6S RNAs bind to RNA polymerase holoenzymes (RNAPs) via their conserved secondary structure (a large internal loop flanked by helical arms). This sequesters a fraction of RNAP molecules, resulting in reduced transcription at many genes. According to transcriptome analyses of wild type versus 6S RNA knockout strains, the RNA affects the expression level of hundreds of genes involved in different cell processes. 6S RNA possesses the unique feature of serving as a transcription template for RNAP, which specifically initiates the synthesis of small product RNAs (pRNAs) at an internal position of 6S RNA. Length and abundance of pRNAs varies with the physiological status of cells. pRNA synthesis is of great significance as it can result in release of 6S RNA from RNAP, providing the enzyme with a mechanism for escaping from its inhibited state. A similar mechanism was discovered for a eukaryotic ncRNA, murine B2 RNA, which inhibits RNAP II activity. This finding can be taken as evidence for a common evolutionary origin of ncRNA-dependent regulation of RNAPs and its significance for the cell. This review summarizes the state of knowledge on the main features and functions of 6S RNAs from different bacterial species, with a special focus on the peculiarities of pRNA synthesis. The majority of insights have been gained for *E. coli* 6S RNA as the most intensely studied model system.

Key words: noncoding RNAs, transcription regulation, RNA polymerase, 6S RNA