

УДК 577.218

## МЕХАНИЗМЫ РАБОТЫ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ: НОВЫЕ ТРЮКИ ДЛЯ СТАРОЙ СОБАКИ

### Обзор

© 2021 A. Ariza-Mateos, A. Nuthanakanti, Alexander Serganov\*

*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University Grossman School of Medicine,  
New York, New York 10016, USA; e-mail: alexander.serganov@nyulangone.org*

Поступила в редакцию 01.05.2021

После доработки 01.05.2021

Принята к публикации 19.05.2021

Обнаруженные почти двадцать лет назад рибопереключателю оказались одной из самых распространенных регуляторных систем у бактерий, они встречаются как у эукариот, так и у архей. В отличие от многих других регуляторных элементов, рибопереключателю полностью состоят из РНК и способны модулировать экспрессию генов в клетке путём прямого связывания небольших молекул. Первоначально считалось, что бактериальные рибопереключателю через регуляторные цепи обратной связи контролируют синтез только тех ферментов и транспортёров, которые связаны с небольшими органическими молекулами. Однако более поздние открытия выявили рибопереключателю, управляющие экспрессией широкого спектра генов и отвечающие на различные классы молекул, включая ионы, сигнальные молекулы и другие. Подавляющее большинство рибопереключателю находятся в 5'-нетранслируемой области мРНК. Рибопереключателю модулируют транскрипцию или трансляцию нижестоящих генов посредством конформационных перестроек в лиганд-чувствительных доменах и примыкающих к ним платформах, контролирующих экспрессию. С годами набор изученных регуляторных механизмов, используемых рибопереключателю, значительно расширился; самые последние исследования подчеркнули важность альтернативных механизмов, таких как деградация РНК, для генетических цепей, управляемых рибопереключателю. В этом обзоре обсуждается множество бактериальных механизмов рибопереключения и показано, каким образом рибопереключателю используют характерные особенности и способы для получения различных регуляторных ответов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибопереключателю, транскрипция, трансляция, мРНК, метаболит.

**DOI:** 10.31857/S032097252108008X

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство бактерий живут в постоянно меняющихся условиях окружающей среды и должны быстро корректировать свой метаболизм в соответствии с доступностью питательных веществ и другими внешними факторами. Бактерии активируют экспрессию генов для производства белков и РНК, необходимых для максимальной адаптации к окружающей среде. Чтобы сэкономить ресурсы, бактерии также отключают гены, продукты которых в данный момент не требуются. Контроль генов часто достигается за счёт регулирования конечным продуктом по механизму обратной связи: когда молекула синтезируется в концентрации, превы-

шающей пороговое значение, ген может быть отключён благодаря чувствительности к продукту этого гена. Этот принцип регуляции, когда молекула контролирует свое собственное производство, получил название саморегуляция. Саморегуляция не обязательно требует изменений в окружающей среде. Гомеостатическое поддержание определенных уровней генного продукта и предотвращение накопления ненужных молекул могут быть одинаково важны для нормальной работы клетки в обычных условиях. Саморегуляция может быть достигнута с помощью механизмов на разных уровнях, включая прямое подавление транскрипции или трансляции и многие посттранскрипционные и посттрансляционные механизмы, такие как ковалентные модификации, ингибирование ферментативной активности и другие.

Помимо механизмов регуляции с помощью белков, являющихся конечными продуктами работы генов, многочисленные примеры регуляции по принципу механизма обратной связи

Принятые сокращения: SD – последовательность Шайн–Дальгарно; SAM – S-аденозилметионин; PRPP – фосфорибозилпирофосфат; c-di-GMP – циклический дигуанилат.

\* Адресат для корреспонденции.

включают небольшие метаболиты, продуцируемые белками в качестве конечных продуктов. В этом случае небольшие молекулы воспринимаются и связываются с белками, а образуемые комплексы модулируют, например, транскрипцию генов посредством связывания с операторами транскрипции [1]. Чтобы реагировать на множество клеточных метаболитов и контролировать экспрессию генов, ассоциированных с этими метаболитами, клеткам пришлось бы вырабатывать десятки белковых репрессоров и активаторов, по одному для каждого гена или оперона. Хотя такой подход возможен, он приведёт к неэффективной трате ресурсов клетки. Может ли регулирование с помощью небольшой молекулы происходить без посредника, чувствительного к нему белка?

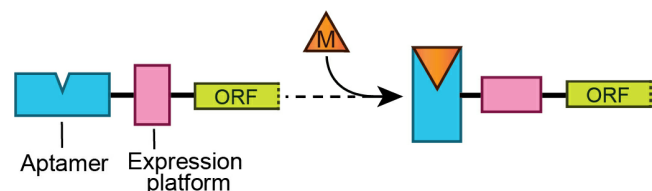
Небольшая молекула  $\rho\rho\text{Gpp}$  может напрямую связываться с РНК-полимеразой и рибосомой, мРНК и другими структурами, влияющими на синтез белков, и модулировать их активность во время адаптации к нехватке аминокислот [2]. Однако  $(\rho)\rho\rho\text{Gpp}$  – это вторичный мессенджер, синтезируемый специальными ферментами, а не конечный продукт работы ферментов, продуцирующих аминокислоты. Хотя прямое связывание с полимеразой и рибосомой представляет собой удобный и эффективный способ контроля экспрессии генов, эти клеточные механизмы сами по себе не могут воспринимать десятки различных клеточных метаболитов. Может ли небольшая молекула связываться с ДНК или мРНК, чтобы модулировать транскрипцию или трансляцию? В то время как двуцепочечная геномная ДНК не обладает достаточной сложностью для специфического распознавания небольшой молекулы, РНК может сворачиваться в сложные трёхмерные структуры для специфического связывания низкомолекулярных соединений [3]. Следовательно, модуляция экспрессии гена с помощью небольшой молекулы кажется возможной, если молекула связывается с мРНК и аллостерически изменяет её структуру, чтобы скрыть или выявить генные регуляторные сигналы, встроенные в последовательность мРНК. Именно эта идея почти 20 лет назад привела к открытию рибопереключателей.

Термин «рибопереключатели» был придуман для регуляторных участков РНК, способных модулировать экспрессию генов посредством прямого восприятия клеточных метаболитов [4–6]. Рибопереключатели обычно располагаются в 5'-нетранслируемых областях (5'-НТО) мРНК генов, участвующих в метаболизме или транспорте лигандов рибопереключателей или родственных клеточных метаболитов [7]. Подавляющее

большинство рибопереключателей обеспечивают регуляцию по принципу механизма обратной связи, контролируя уровни транскрипции или трансляции. Рибопереключатели обычно состоят из двух частей: эволюционно консервативного «аптамерного» домена, воспринимающего метаболит, и вариативной «платформы экспрессии», содержащей сигналы экспрессии генов (рис. 1). Различные платформы экспрессии могут сопровождать один и тот же тип сенсорного домена, но с разными результатами экспрессии генов.

Способность рибопереключателей принимать две взаимоисключающие конформации РНК определяет основу генетического ответа. Специфичное связывание метаболитов вызывает изменение конформации сенсора метаболита и платформы экспрессии, что вызывает один генетический ответ; в то же время адаптация к альтернативной конформации приводит к противоположному эффекту (рис. 1). Рибопереключатели включают более 40 классов, которые распознают около 30 различных небольших молекул, от ионов до витаминов [8]. Молекулярной основой специфичности сенсоров является формирование сложных трёхмерных структур, настроенных на точное распознавание лиганда или лигандов и отторжение похожих метаболитов и предшественников [9]. Поскольку размер аптамеров (т.е. его лиганд-узнающих частей) составляет примерно 30–250 нуклеотидов, их структура и особенности распознавания метаболитов сильно различаются. Напротив, платформы экспрессии чаще всего сворачиваются в шпильки, которые функционируют как терминаторы транскрипции, антитерминаторы или структуры, препятствующие связыванию рибосомы.

Недавние исследования определили или предложили концептуально новые механизмы рибопереключателей и обнаружили множество вариаций общих механизмов, тем самым значительно расширив репертуар функционирования



**Рис. 1.** Домены типичного рибопереключателя. Чувствительный к метаболитам аптамерный домен, платформа экспрессии и открытая рамка считывания (ORF) гена показаны прямоугольниками. Связывание метаболита (M) стабилизирует альтернативную конформацию доменов рибопереключателя. Две конформации рибопереключателя вызывают два противоположных регуляторных ответа (не показаны)

рибопереключателей. Чтобы проиллюстрировать универсальность рибопереключателей в генетическом контроле, в этом обзоре рассматриваются типичные механизмы рибопереключателей и обсуждаются несколько новых открытий и гипотез.

### ДОРОГА, ВЕДУЩАЯ К ОТКРЫТИЮ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

Хотя открытие рибопереключателей стало неожиданностью для многих исследователей, ряд экспериментов подготовил почву для их обнаружения. Одним из важных факторов было открытие обратной связи с помощью белковых авторепрессоров, таких как рибосомные белки [10]. Чтобы сбалансировать биосинтез рРНК и рибосомных белков для сборки рибосомы, несколько рибосомных белков, синтезируемых в избытке по сравнению с рРНК, могут связываться с 5'-НТО своей собственной мРНК и предотвращать инициацию трансляции за счёт секвестирования сайта связывания рибосомы и кодона инициации. Мишени мРНК и рРНК этих белков имеют некоторое сходство либо на уровне последовательности, либо на структурном уровне, но сродство связывания рРНК всегда превышает сродство связывания мРНК, чтобы гарантировать надлежащий контроль [11]. Контроль с помощью механизма обратной связи не ограничивается одними белками. Так называемые «Т-боксы» в мРНК специфически связывают тРНК и, в зависимости от присутствия на тРНК ковалентно присоединенной аминокислоты, способствуют сворачиванию нижележащих областей в терминаторы транскрипции или антитерминаторы, напоминающие контролирующие элементы транскрипционных рибопереключателей [12]. Специфическое связывание небольшой молекулы с РНК также не было новым наблюдением. Связывание гуанозинового кофактора самосплайсирующимся интроном группы I было описано почти за два десятилетия до открытия рибопереключателей [12]. Селекция *in vitro* РНК-аптамеров, специфичных для различных малых молекул, укрепила мнение о том, что РНК может избирательно распознавать небольшие молекулы с различными характеристиками [13–15]. Связывание аминокислот с мРНК и их участие в регуляции также наблюдали в случаях аттенуации, когда белки и небольшие молекулы коллективно перестраивают структуру мРНК и вызывают терминацию транскрипции [16].

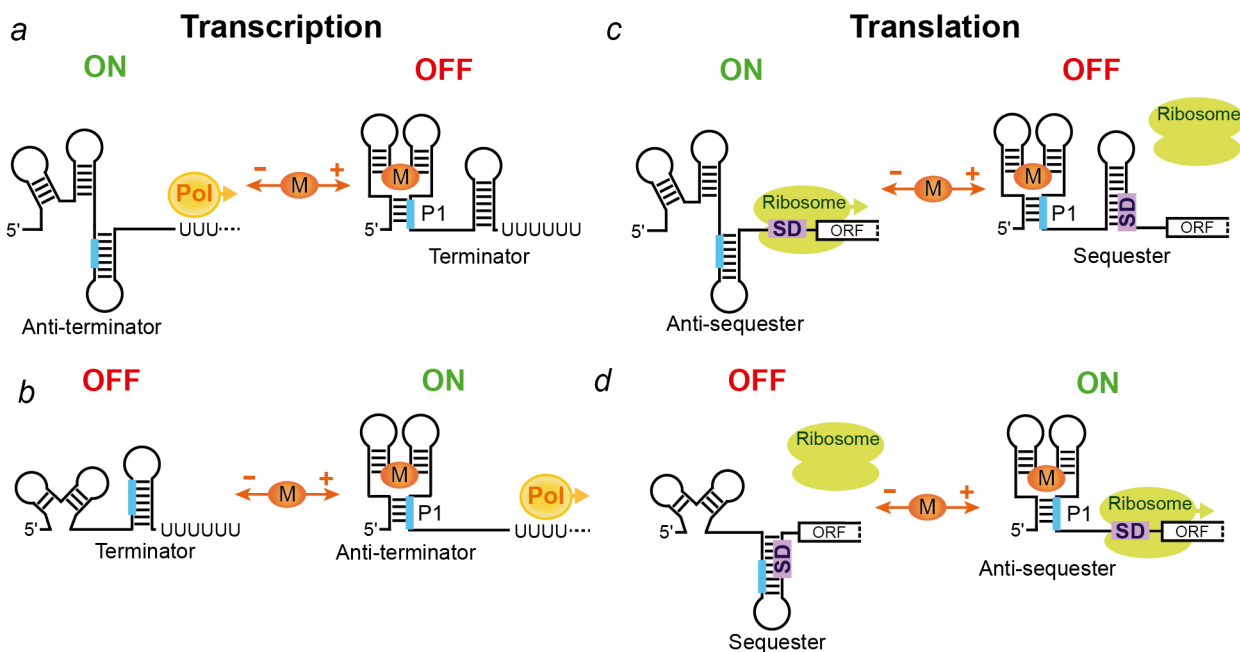
Идентификация первых рибопереключателей была в первую очередь обусловлена наблю-

дениями, что тиамин, рибофлавин и кобаламин ингибируют гены биосинтеза витаминов В1, В2 и В12 соответственно. мРНК этих генов содержит консервативные регуляторные последовательности или «боксы»; однако не было обнаружено специфичного для этих боксов белкового репрессора [17, 18], что свидетельствует о прямом связывании витаминов с мРНК [17, 19–21]. После неудачных попыток [22, 23] было убедительно показано, что три производных витаминов, аденозилкобаламин (AdoCbl) [4], тиаминпирофосфат (ТРР) [5, 6] и флавиномононуклеотид (FMN) [6], связывают соответствующие мРНК, модулируют конформацию РНК и регулируют экспрессию генов. После обнаружения рибопереключателей в бактериях последовали примеры из других форм жизни, хотя активные эукариотические рибопереключатели почти не распространялись и представлены только связывающими ТРР [24–26]. Напротив, многие виды бактерий обладают рибопереключателями, многие бактерии содержат различные классы рибопереключателей, а некоторые виды имеют несколько рибопереключателей одного и того же класса, участвующих в контроле различных генов и оперонов [8].

### КАНОНИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАБОТЫ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

Первые сообщения об идентификации рибопереключателей, которые содержат определенный сенсор метаболита и платформу экспрессии, сразу предложили четыре основных механизма контроля экспрессии генов (рис. 2) [7]. Связывание метаболитов стабилизирует общую структуру сенсорного домена и облегчает образование и стабилизацию спирали, которая обычно блокирует сенсорный домен. Эта регуляторная спираль, обозначенная как «Спаривание 1» (P1), включает область, обычно находящуюся на 3'-конце, способную к альтернативному спариванию оснований с комплементарной последовательностью, которая располагается ниже, когда метаболит не связан с доменом-сенсором. Альтернативное спаривание оснований спирали P1 является квинтэссенцией регуляции для большинства рибопереключателей; однако клеточные процессы контроля и задействованные механизмы сильно различаются. У бактерий канонические механизмы рибопереключения основаны на терминации транскрипции и инициации трансляции.

Первые два механизма рассчитаны на способность РНК-полимеразы «оглядываться» на транскрибируемую мРНК и прекращать тран-



**Рис. 2.** Канонические механизмы рибопереключателей. *a* – Ингибирование экспрессии генов через механизм терминации транскрипции. При отсутствии метаболита домен аптамера не сворачивается, а рибопереключателем образует шпильку-антитерминатор. РНК-полимераза (Pol) транскрибирует весь ген, включая его экспрессируемую часть. Связывание метаболита (M) стабилизирует связанную с лигандом форму, закрытую спиралью P1, и способствует образованию внутреннего терминатора транскрипции, тем самым выключая экспрессию гена. Фрагмент рибопереключателем (жирная линия) участвует в двух альтернативных соединениях оснований в безлигандном и связанном с лигандом состояниях рибопереключателем. *b* – Активация экспрессии гена через механизм терминации транскрипции. При отсутствии метаболита рибопереключателем образует терминатор транскрипции. В присутствии метаболита фрагмент, участвующий в образовании терминатора, образует альтернативное спаривание оснований внутри P1, которое блокирует связанный с метаболитом аптамер. *c* – Подавление трансляции связыванием метаболитом. Состояние без метаболитом позволяет рибосомам связываться с последовательностью Шайн–Дальгарно (SD) (прямоугольник с надписью «SD») и инициировать трансляцию. После связывания лиганда последовательности SD изолируются в структуре шпильки, и трансляция не может инициироваться. *d* – Активация трансляции. Связывание метаболитом приводит к регуляторному ответу, противоположному ответу, показанному на панели *c*

скрипцию после синтеза внутреннего терминатора – самокомплементарной области РНК, которая сворачивается в шпильку, за которой следует отрезок из остатков уридилевой кислоты (рис. 2, *a* и *b*). Такие внутренние терминаторы транскрипции могут образовываться в присутствии или в отсутствие метаболита, что приводит к репрессии или активации транскрипции соответственно. Преждевременное прекращение транскрипции предотвращает производство мРНК для трансляции и, следовательно, экономит нуклеотиды и другие ресурсы, необходимые для создания мРНК. Неудивительно, что терминация транскрипции является преобладающим механизмом работы рибопереключателем и часто используется для контроля по принципу отрицательной обратной связи. Интересно, что механизм транскрипции, опосредованный рибопереключателем, не включает истинное «переключение» рибопереключателем и может быть лучше описан как «молекулярное слияние» [27]. В самом деле, как только РНК вступает в про-

цесс регуляции, этот процесс не может быть отменён. РНК-полимераза не может удлинить терминированную РНК и не может остановить транскрипцию после прохождения через последовательность терминатора, если шпилька терминатора не была образована.

Два других классических механизма рибопереключения основаны на том факте, что рибосомная субъединица 30S требует спаривания оснований между сайтом связывания 16S рРНК рибосомы (последовательность Шайн–Дальгарно или последовательности SD) и неспаренным иницирующим кодоном для эффективной инициации трансляции (рис. 2, *c* и *d*). Спаривание оснований SD-последовательности и кодона инициации трансляции внутри шпильки может предотвратить загрузку рибосомы и трансляцию мРНК. Освобождение последовательности SD и кодона инициации позволит рибосоме связываться и транслировать мРНК. Регулирование уровня трансляции требует транскрипции по крайней мере 5'-конца мРНК и ка-

жется менее экономичным, чем контроль транскрипции. Однако регулирование трансляции имеет свои преимущества. Во-первых, это может позволить контролировать отдельный ген в полицистронной мРНК, если ген транслируется с помощью собственной последовательности SD. Во-вторых, время отклика для контроля трансляции может быть очень быстрым, поскольку мРНК уже синтезирована. В случае активации трансляция может начаться сразу после освобождения последовательности SD. Наконец, трансляционные рибопереключателы могут быть настоящими переключателями [28], связывающими и высвобождающими метаболит, а также активирующими или подавляющими трансляцию одной и той же молекулы мРНК в зависимости от колебаний концентрации метаболита. Однако рибопереключателы обычно не используют эту опцию, потому что большинство рибопереключателов управляются кинетически, а не термодинамически; другими словами, для активации им требуется концентрация метаболита выше, чем  $K_D$  [27]. Кинетически управляемые трансляционные рибопереключателы могут выбирать регуляторный путь сразу после того, как 5'-конец мРНК синтезирован. Напротив, достижение термодинамического равновесия может быть длительным процессом, приближающимся ко времени жизни мРНК или превышающим его, и делающим ответ «устаревшим». Поскольку транскрипция и трансляция у бактерий связаны, трансляция начинается вскоре после инициации транскрипции, до завершения транскрипции.

### ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ В КАНОНИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ РАБОТЫ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЯ

Многие рибопереключателы, использующие канонические регуляторные механизмы, содержат отдельный аптамерный домен и платформу экспрессии, каждый из которых способен к сворачиванию альтернативно в зависимости от доступности лиганда рибопереключателы. Для эффективной регуляции такое расположение двух доменов не является абсолютно необходимым требованием, и некоторые рибопереключателы объединяют оба элемента, сохраняя при этом регуляторный ответ «двух состояний» нетронутым.

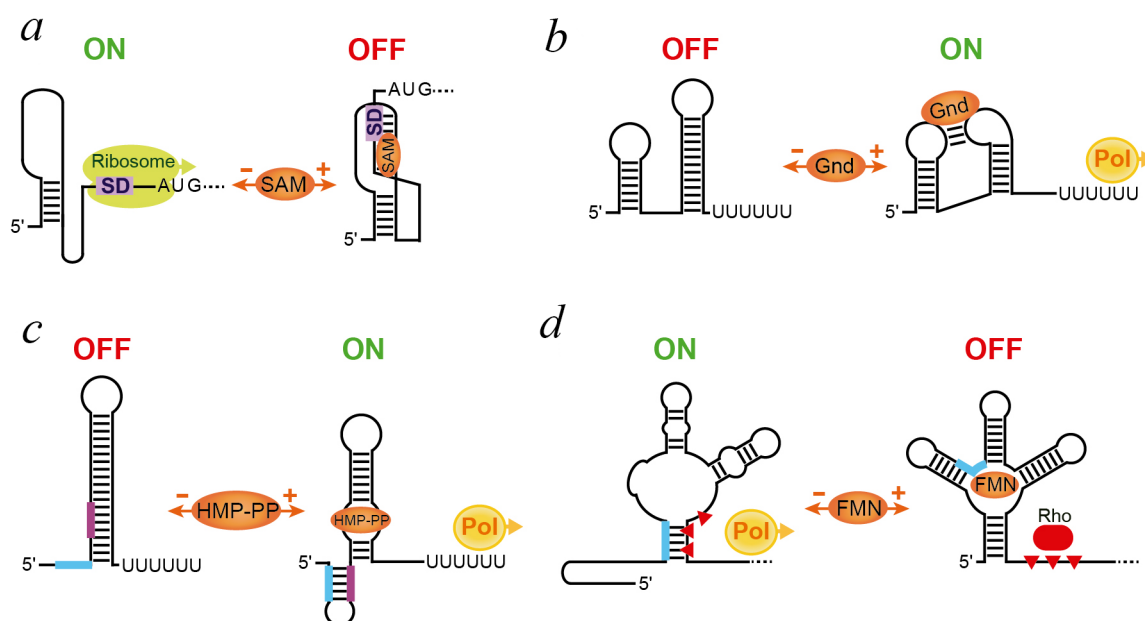
Поскольку для инициации трансляции не требуется структура, присутствующая в мРНК, многие репрессоры трансляции представляют собой оптимизированные рибопереключателы, у которых отсутствует выделенная шпилька, изолирующая или открывающая последователь-

ность SD. В этих рибопереключателых не существует платформы экспрессии, а последовательность SD можно рассматривать как неотъемлемую часть связанного с лигандом аптамерного домена. Например, в рибопереключателе SAM-III [29] связывание лиганда происходит с участием SD-последовательности при спаривании оснований в сочленении спиралей [30]. Последовательность SD становится недоступной для связывания с рибосомой, и трансляция не может иницироваться.

Участие SD-последовательности в сворачивании связанного с лигандом рибопереключателы особенно важно для аптамеров, принимающих так называемую структуру псевдоузла. В нескольких рибопереключателых, таких как SAM-II, биохимические и структурные исследования подтвердили биоинформатически предсказанное удалённое спаривание оснований между удалёнными участками последовательности SD и внутренней петлёй в середине аптамера [31, 32]. Это третичное спаривание приводит к формированию структуры псевдоузла, которая включает две коаксиально уложенные друг на друга спирали, соединённые двумя петлями (рис. 3, *a*). Предполагают, что и другие репрессоры трансляции, которые, по прогнозам, формируют сходные спаривания между удалёнными участками, также образуют структуры псевдоузлов при связывании лиганда [33].

В отличие от трансляционных рибопереключателов количество примеров оптимизированных транскрипционных рибопереключателов ограничено [34, 35]. Рибопереключател гуанидин-IV использует петлю шпильки терминатора для формирования структуры аптамера за счёт спаривания оснований с внутренней петлёй в теле аптамера (рис. 3, *b*) [34]. Следовательно, связывание лиганда нарушает структуру терминатора и включает транскрипцию. В отсутствие гуанидина образование терминатора транскрипции не затруднено, и транскрипция преждевременно прерывается.

Рибопереключател, отвечающий на предшествующий тиаминпирофосфата (ТРП), НМР-РР, демонстрирует ещё более необычную архитектуру, в которой очень маленький лиганд-чувствительный аптамер почти полностью встроен в классический терминатор внутренней транскрипции (рис. 3, *c*) [35]. Рибопереключател использует одну и ту же последовательность РНК для сворачивания в две взаимоисключающие структуры: конфигурацию терминатора без лиганда, преждевременно прерывающую транскрипцию, и конфигурацию связанного с лигандом аптамера, предотвращая раннюю терминацию транскрипции.



**Рис. 3.** Оптимизированные и неканонические механизмы работы рибопереключателей. *a* – Регуляция инициации трансляции рибопереключателем SAM-II [31, 101]. Связывание с SAM стабилизирует фолдинг псевдоузла аптамера. Последовательность SD участвует в формировании псевдоузла и не может быть доступна для рибосомы. При отсутствии SAM псевдоузел не образуется, рибосома может связываться с последовательностью SD и инициировать трансляцию мРНК. *b* – Предполагаемый механизм активации транскрипции рибопереключателем гуанидин-IV, включающий третичные взаимодействия между аптамерным доменом и платформой экспрессии [34]. При связывании лиганда структура терминатора транскрипции нарушается за счёт разъединения оснований на расстояние больше необходимого для образования структуры «аптамера». Петли содержат консервативные нуклеотиды, участвующие в третичных взаимодействиях. Терминатор транскрипции обычно формируется в отсутствие гуанидина. *c* – Активация транскрипции рибопереключателем HMP-PP [35]. В отсутствие лиганда рибопереключателем сворачивается в канонический терминатор транскрипции. Связывание лиганда способствует образованию альтернативной конформации, разрушающей терминатор. Толстыми линиями обозначены ключевые фрагменты, участвующие в формировании альтернативных структур. *d* – Предполагаемый механизм Rho-зависимой репрессии транскрипции рибопереключателем FMN из *Escherichia coli* [36]. В конформации, связанной с FMN, фактор Rho способствует прекращению транскрипции С-богатой области, расположенной ниже аптамера. При отсутствии лиганда фрагмент в 5'-половине аптамера соединяется с С-богатой областью, тем самым препятствуя терминированию транскрипции

Некоторые рибопереключатели, обнаруженные у грамотрицательных бактерий, в отличие от их аналогов в *Bacillus subtilis*, по-видимому, не имеют канонических терминаторов. Было показано, что такие рибопереключатели контролируют экспрессию генов на уровне транскрипции, но с помощью фактора терминации Rho [36]. Rho – это общий фактор терминации, который перемещается с РНК-полимеразой и отвечает за терминацию примерно 20% транскрипционных единиц в *E. coli* [37]. Rho прерывает транскрипцию незащищённых РНК на сайтах, которые обычно обогащены С-остатками и лишены G-остатков. В рибопереключателе флавиномононуклеотида (FMN) *E. coli* стабилизация FMN-связанного аптамера индуцирует Rho-зависимую терминацию транскрипции ниже аптамера и выше кодирующей белок области (рис. 3. *d*) [36]. Нарушение структуры аптамера при отсутствии FMN вызывает альтернативную конформацию нетранслируемой области, кото-

рая устраняет Rho-зависимую терминацию и позволяет транскрипции продолжаться до конца гена.

### МУЛЬТИЛИГАНДНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

**Восприятие более чем одной молекулы лиганда одним сенсором.** Многие наблюдения того, что сенсорный домен рибопереключателем связывает одну молекулу метаболита, никогда не исключали возможности того, что рибопереключателем может воспринимать две или более молекулы лиганда.

Одно из первых доказательств появилось после биохимической и структурной характеристики рибопереключателем М-бокс (Mg-I), отвечающего на катионы  $Mg^{2+}$  [38, 39]. Эта большая РНК связывает несколько катионов  $Mg^{2+}$

для сворачивания и генетического ответа, но другие катионы также могут заменять катионы  $Mg^{2+}$ , чтобы стимулировать сворачивание РНК. Более селективный рибопереключател  $NiCo$  реагирует на катионы  $Ni^{2+}$  или  $Co^{2+}$  [40] и, возможно, на  $Fe^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  [41]. Структура и биохимические данные показывают, что рибопереключател одновременно связывает четыре катиона  $Ni^{2+}$  или  $Co^{2+}$ , хотя неясно, все ли сайты активны при физиологических значениях концентраций этих катионов [40]. Отдельный сенсор иона металла, рибопереключател  $Mn^{2+}$ , содержит два соседних сайта связывания металла – один для  $Mn^{2+}$ , а другой для  $Mg^{2+}$  [42]. Хотя катион  $Mn^{2+}$  в миллимолярных концентрациях может заменять  $Mg^{2+}$  в его сайте связывания *in vitro*, эта ситуация, вероятно, не является биологически значимой, поскольку *E. coli* поддерживает внутриклеточную концентрацию  $Mn^{2+}$  на низких микромолярных уровнях, чтобы избежать токсичности.

Связывание с несколькими лигандами не ограничивается катионами металлов, которые из-за небольшого размера могут иметь ограничения в управлении фолдингом РНК, если они связываются с ней в единственном числе. Рибопереключател ТНФ-I связывает две молекулы тетрагидрофолата (ТГФ) [43]. Рибопереключател стратегически размещает одну молекулу ТГФ в шарнирной области, чтобы гарантировать параллельное выравнивание основного стержня с отпочкованной шпилькой, в то время как вторая молекула ТГФ связывается в конце шпильки и обеспечивает дальнедействующие контакты с основным стержнем. Эти третичные взаимодействия стабилизируют спираль Р1 для регуляторного ответа.

Рибопереключател циклического диаденозинмонофосфата (c-di-AMP) взаимодействует с двумя молекулами c-di-AMP в двух сайтах связывания, расположенных поперёк псевдосимметричного аптамера четырёхугольной формы [44, 45] (рис. 4, а). Несмотря на сходство, сайты не равноценны для связывания лиганда, и, хотя нарушение в работе одного сайта устраняет способность связываться с обоими сайтами, мутация второго сайта только снижает способность связываться с первым сайтом [44]. В зависимости от платформы экспрессии рибопереключател подавляет транскрипцию или трансляцию.

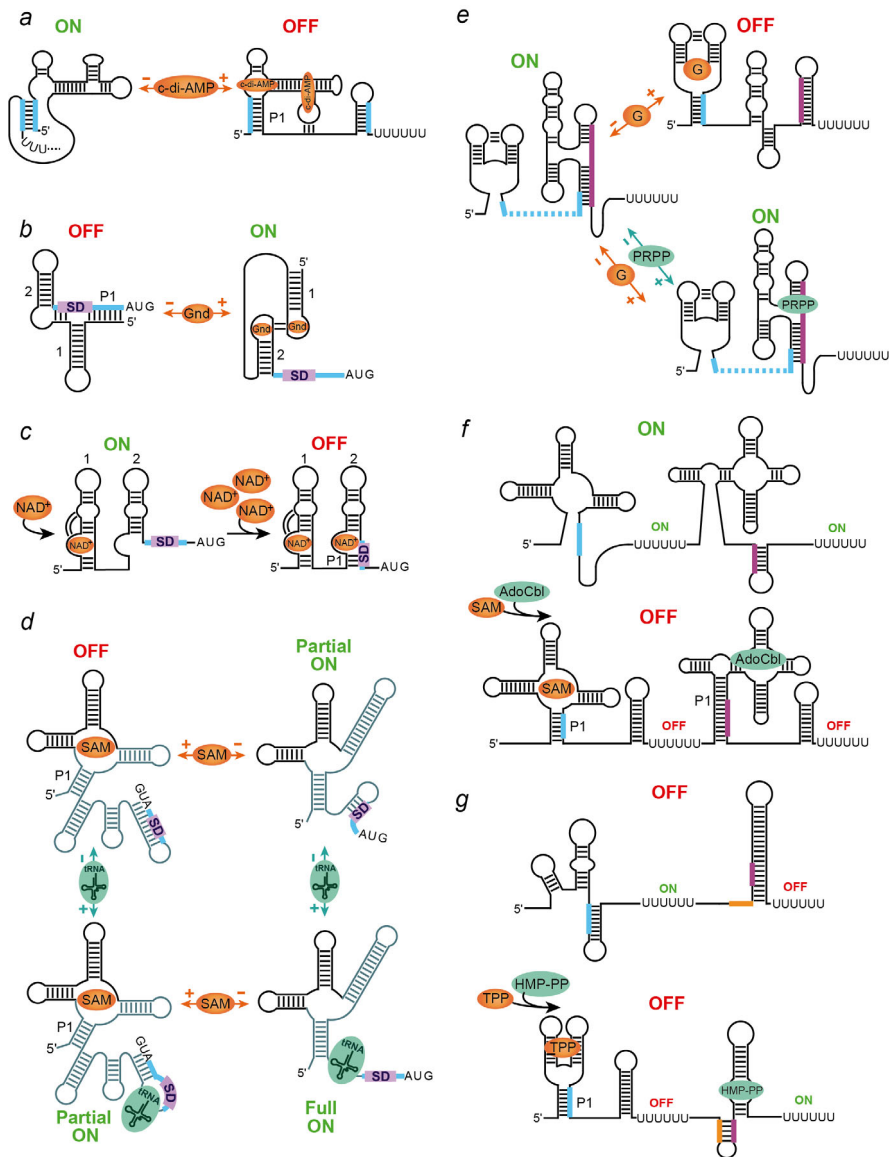
Ряду лигандов требуется помощь других небольших молекул, обычно катионов металлов, для эффективного связывания с рибопереключателями. Практически все метаболиты, содержащие фосфатную группу, нейтрализуют эти фрагменты катионами  $Mg^{2+}$ , которые остаются

связанными с лигандом и опосредуют его взаимодействия с РНК [46–48]. Три катиона  $Mg^{2+}$  инкапсулируют фторид-анион и помогают этому маленькому лиганду осуществлять прямое сворачивание фторидного рибопереключателя [49]. Катионы  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  способствуют связыванию карбоксилатной части лизина и глицина соответственно с родственными им рибопереключателями [50, 51].

Хотя приведённые выше примеры соответствуют сигнальной модели с одним входом, существуют рибопереключателы, управление которыми зависит или включает в себя двойной вход. Недавнее исследование показало, что реакция лизинового рибопереключателя *lysC B. subtilis* на лизин сильно зависит от незначительных изменений внутриклеточных уровней катионов  $Mg^{2+}$  [52]. В нижней части физиологического диапазона концентраций  $Mg^{2+}$  (<1 мМ) аптамер остаётся неструктурированным и требует более высокой концентрации лизина для ответа. Увеличение концентрации  $Mg^{2+}$  на 1 мМ заранее организует структуру для связывания лизина, так что лиганд может взаимодействовать с рибопереключателем при концентрации на два порядка ниже. Таким образом, изменения уровней концентрации  $Mg^{2+}$ , например в нормальных условиях роста и в стрессовой среде, могут определять активность рибопереключателя.

Специфичность рибопереключателя часто означает, что сродство связи рибопереключателя с родственными метаболитами выше, чем с аналогичными молекулами. Считается, что в клетках подобные неродственные лиганды отвергаются рибопереключателем, и регуляторный ответ приписывается тому лиганду, который лучше связывается. Тем не менее при высоких концентрациях неродственные лиганды могут конкурировать с родственными лигандами за связывание с рибопереключателем. При связывании неродственный лиганд может не продвигать сворачивание рибопереключателя до связанного с лигандом состояния и вызывать соответствующий регуляторный ответ. Исследование *in vivo* показало, что активность рибопереключателя, рибозима *glmS B. subtilis*, модулируется как родственными лигандами глюкозамин-6-фосфатом (GlcN6P), активирующим ответ, так и его несколькими предшественниками, ингибирующими ответ [53]. Таким образом, в клетках даже рибопереключателы с одним входом могут интегрировать информацию из массива химических сигналов и реагировать на основе концентраций нескольких соединений.

**Связывание одних и тех же лигандов несколькими сенсорами.** В то время как большинство рибопереключателей используют один аптамер



**Рис. 4.** Механизмы мультилигандного зондирования и их регуляция. *a* – Предполагаемый механизм контроля транскрипции с помощью рибопереключателея *c*-di-AMP [44, 102]. Рибопереключателея требует связывания двух молекул *c*-di-AMP для адаптации структуры аптамера, связанного с лигандом, и терминации транскрипции [44, 45]. *b* – Механизм активации трансляции рибопереключателея гуанидин-II [60–62]. Связывание двух лигандов с консервативными апикальными петлями способствует образованию димера «голова к голове», который высвобождает последовательность SD для связывания с рибосомой. *c* – Предполагаемый ступенчатый механизм трансляционной репрессии с помощью рибопереключателея NAD<sup>+</sup> [66]. Поскольку NAD<sup>+</sup> всегда присутствует в клетках, одна молекула NAD<sup>+</sup> может связываться с формирующимся транскриптом, как только аптамер 1 транскрибируется. Высокие концентрации NAD<sup>+</sup> будут стимулировать связывание NAD<sup>+</sup> с аптамером 2, который имеет более низкое сродство к лиганду, и изолирование последовательности SD в структуре аптамера. *d* – Гипотетический механизм рибопереключателея SAM-I-tRNA из *Xanthomonas campestris* [67]. При обнаружении различных концентраций SAM и tRNA<sup>Met</sup> рибопереключателея может принимать четыре различных состояния, которые соответствуют четырём регуляторным ответам. Фрагменты РНК, участвующие в наиболее обширных конформационных перестройках, показаны более светлым цветом. *e* – Регуляторные ответы на тандемный рибопереключателея гуанин-PRPP [68]. В безлигандной форме рибопереключателея активирует транскрипцию. Связывание гуанина при отсутствии PRPP разрушает аптамер PRPP и вызывает преждевременное прекращение транскрипции. Связывание PRPP отдельно или в присутствии гуанина стабилизирует аптамер PRPP и предотвращает связывание гуанина, что приводит к непрерывной транскрипции. *f* – Регуляторные ответы системы рибопереключателея SAM-I и AdoCbl [73]. Система включает транскрипцию при отсутствии обоих лигандов. Связывание одного лиганда или обоих лигандов одновременно прерывает транскрипцию и выключает экспрессию гена. *g* – Регуляторные ответы системы рибопереключателея TPP и HMP-PP [35]. Рибопереключателея TPP подавляет транскрипцию при связывании лиганда, в то время как рибопереключателея HMP-PP активирует транскрипцию в связанной с лигандом форме. Следовательно, ген экспрессируется только при отсутствии TPP и в присутствии HMP-PP. Состояния без лиганда, TPP-связанный, TPP-связанный/HMP-PP-связанный выключают экспрессию гена



для связывания лиганда, несколько классов рибопереключателей регулируют экспрессию генов с помощью нескольких смежных аптамеров, каждый из которых имеет сайт связывания лиганда, за которым следует единственная платформа экспрессии. Несколько аптамеров позволяют добиться более чётких количественных характеристик ответов на изменение концентрации лиганда. Первый пример таких рибопереключателей относится к началу 2000-х годов [54]. Это исследование обнаружило глицин-специфические рибопереключатели, состоящие из двух похожих сенсорных доменов tandemно-расположенных друг относительно друга; это исследование указывало на кооперативное связывание двух молекул глицина, по одной молекуле на сенсор. Структурные и биохимические исследования выявили межмолекулярные взаимодействия между двумя модулями [51, 55]. Хотя такая кооперативная связь была поставлена под сомнение [56], недавнее исследование подтвердило существование кооперативности, которая может быть замаскирована разницей в средстве связывания двух сенсоров [57].

Ещё несколько рибопереключателей содержат несколько аптамеров, за которыми следует одна платформа экспрессии. Более половины рибопереключателей глутамин-*glnA* (глутамин-I) расположены в tandemной ориентации, где два или три аптамера разделены небольшими линкерными областями [58]. Многие рибопереключатели глутамин-I имеют сходные линкерные последовательности, которые, как предполагается, образуют пару оснований с последовательностью, расположенной ниже 3'-домена. Рентгеновская кристаллическая структура показала связывание лиганда в стыке, соединяющем стебли рибопереключатателя, и их большую перегруппировку при связывании лиганда [59]. Биохимические эксперименты не обнаружили доказательств кооперативности [58] и, хотя структурные исследования предсказывают сходное связывание лиганда со всеми аптамерами tandemных рибопереключателей, преимущества наличия более чем одного аптамера не ясны.

Рибопереключателю гуанидин-II состоит из двух шпилек, содержащих сходные и высококонсервативные апикальные петли, которые кооперативно связывают свободный гуанидин [60] (рис. 4, *b*). Структурные исследования отдельных аптамеров показали, что каждая петля содержит сайт связывания гуанидина и что связывание гуанидина облегчает гомодимеризацию двух аптамерных доменов посредством третиного спаривания оснований между петлями [61, 62]. Образование этого лиганд-зависимого димера с конфигурацией «голова к голове»

может объяснить кооперативное связывание гуанидина, наблюдаемое в биохимических экспериментах с полноразмерным рибопереключателем [60], и предполагает регуляторный механизм, основанный на димеризации двух аптамеров внутри одного рибопереключатателя [62, 63]. Гуанидин-II действует как трансляционный рибопереключателю «ON». При отсутствии гуанидина последовательность SD изолируется спариванием оснований с линкерной областью и нуклеотидами на 5'-конце первого аптамера, тем самым предотвращая инициацию трансляции. Связывание гуанидина способствует димеризации двух аптамеров и обеспечивает пространственное разделение последовательности SD от комплементарной последовательности анти-SD. Неспаренная последовательность SD может связывать рибосому и иницировать трансляцию.

Так же как рибопереключателю гуанидин-II, рибопереключателю никотинамид-адениндинуклеотид ( $NAD^+$ ) класса I, образован двумя шпильками; однако подобные консервативные области расположены в выпуклых петлях (рис. 4, *c*) [64]. Структурные исследования показали, что  $NAD^+$  действительно связывает РНК в этом выступе [65, 66]. Биоинформатика выявила небольшие различия между двумя аптамерами в центральных областях, а исходное исследование не сообщало о связывании  $NAD^+$  со вторым аптамером [64]. В более поздней работе было обнаружено связывание со вторым аптамером, но с гораздо более низким средством, чем с первым аптамером [66]. Исследование структуры показало, что связывание лиганда стабилизирует третичный контакт между лиганд-связывающим сайтом и средней нерегулярной областью РНК. У второго аптамера этот контакт отсутствует. Интересно, что оба аптамера распознают только аденозиновый фрагмент лиганда, а не никотинамидный фрагмент, что позволяет предположить, что структуры отдельных доменов, возможно, не охватывают все взаимодействия с лигандом. Вероятно, никотинамидный фрагмент лиганда, связанный с аптамером 1, может распознаваться аптамером 2. Поскольку  $NAD^+$  всегда присутствует в клетках, существует интригующая вероятность того, что рибопереключателю действует как двухконцентрационный сенсор [66]. При низких концентрациях  $NAD^+$  связывается с первым аптамером, оставляя аптамер 2 несвязанным и неструктурированным, SD-последовательность открытой для трансляции. В более высоких концентрациях  $NAD^+$  также связывается с аптамером 2, способствуя спариванию оснований SD-последовательности и запуская репрессию трансляции.

**Восприятие различных лигандов несколькими сенсорами.** Среди наиболее интересных открытий в области рибопереключателей – открытие рибопереключателей с двумя входами, которые обладают отдельными сайтами связывания для разных лигандов, но работают согласованно через единую платформу экспрессии. Эти открытия особенно интересны с эволюционной точки зрения. Хотя дубликация генов может располагать похожие аптамеры рядом друг с другом, труднее всего представить, как сенсоры с разной специфичностью эволюционировали, чтобы объединиться и контролировать одну и ту же единицу экспрессии.

Недавно был предложен интересный механизм двойного входа для рибопереключателя SAM-I, который регулирует синтез метионина у *X. campestris* (рис. 4, d) [67]. Этот рибопереключател в первую очередь отвечает на клеточный S-аденозилметионин (SAM) на уровне трансляции, однако платформа экспрессии также содержит сайт связывания для незаряженной инициаторной Met-тРНК. Связывание тРНК и SAM, по-видимому, способствует образованию нескольких альтернативных пар оснований и вызывает ряд регуляторных ответов. В то время как связывание SAM изолирует последовательность SD и отменяет трансляцию, одновременное связывание тРНК изолирует последовательность анти-SD и частично высвобождает последовательность SD для связывания рибосомы. Частичная экспрессия генов также может наблюдаться при отсутствии обоих лигандов, тогда как полная депрессия, по-видимому, требует связывания тРНК при отсутствии SAM.

Сложный регуляторный результат наблюдался также в рибопереключателе, включающем сенсор гуанина, за которым следует сенсор фосфорибозилпирофосфата (PRPP) [68] (рис. 4, e). Последовательность между этими аптамерами короткая, и 5'-область сенсора PRPP перекрывается с 3'-областью предшествующего гуанинового сенсора. Следовательно, связывание гуанина препятствует образованию сенсора PRPP и облегчает образование терминатора транскрипции, тем самым останавливая транскрипцию. С другой стороны, аптамер PRPP «преформирован» при отсутствии как гуанина, так и PRPP [69, 70]. Эта конформация аптамера препятствует образованию терминатора и позволяет транскрипции идти до конца. В присутствии обоих лигандов при связывании с рибопереключателем PRPP доминирует и предотвращает связывание гуанина, обеспечивая непрерывную транскрипцию гена [68].

Особый механизм был продемонстрирован для рибопереключател цикло-di-GMP (цикли-

ческий дигуанилат, c-di-GMP), который расположен перед самосплайсирующимся интроном группы I [71]. Этот РНК-регулятор сочетает в себе самосплайсинг и активацию трансляции для регулирования последующих генов. Связывание c-di-GMP с его аптамером делает возможным фолдинг ядра интрона, связывание GTP с сайтом сплайсинга 5'-интрона и самовырезание интрона. Удаление интрона объединяет две удалённо расположенные части последовательности SD с образованием полной последовательности SD для инициации трансляции [71, 72]. При отсутствии c-di-GMP GTP связывается в альтернативном сайте, и новое расщепление приводит к укорачиванию последовательности SD, которая не может эффективно связать рибосому и не инициирует трансляцию.

### «СОТРУДНИЧЕСТВО» НЕЗАВИСИМЫХ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

Хотя большинство рибопереключателей функционируют как единая регуляторная единица, которая включает один или несколько аптамеров и единую платформу экспрессии или эквивалентную область мРНК, некоторые рибопереключател содержат две независимые регуляторные единицы в тандемном расположении [35, 73–75]. Чаще всего эти рибопереключател содержат сенсоры, отвечающие на один и тот же метаболит, например TRP, за которым следует тот же тип платформы экспрессии, как у терминатора транскрипции [73]. Вероятно, композитные переключател, напоминающие двойной TRP-рибопереключател, обеспечивают более выраженный количественный ответ или большую чувствительность к изменениям концентрации метаболитов по сравнению с одиночными рибопереключателами. В некоторых случаях сенсоры реагируют на разные лиганды.

В тандемной системе рибопереключател SAM-I и AdoCbl связывание SAM или AdoCbl с их соответствующими сенсорами вызывает терминацию транскрипции в отдельном рибопереключателе, что отменяет транскрипцию гена. Соответственно, ген включается только тогда, когда оба лиганда присутствуют в клетках в концентрациях ниже пороговых (рис. 4, f).

Тандемная система рибопереключател TRP и HMP-PP содержит репрессирующий рибопереключател TRP, за которым следует активирующий рибопереключател HMP-PP. Эта система контролирует экспрессию гена, который кодирует фермент, необходимый для синтеза другого предшественника на пути образова-

ния TRP [35]. Бактериям не нужно производить TRP, когда его много; следовательно, связывание TRP с его аптамером останавливает экспрессию нижележащего гена независимо от концентрации НМР-РР (рис. 4, g). Когда TRP отсутствует, ответ может следовать двум сценариям. Если в клетках также отсутствует НМР-РР, ген не экспрессируется. Высокие концентрации НМР-РР активируют экспрессию гена.

Существование систем рибопереключателей, в которых отдельные регуляторные единицы с различной специфичностью объединены в тандемные структуры, открывает возможность интеграции различных сигналов из окружающей и внутриклеточной среды. Каждый рибопереключателю воспринимает один сигнал, однако регуляторный ответ носит комбинаторный характер. Такие сложные системы могут позволить точное регулирование, зависящее от присутствия конечных продуктов, а также от метаболического состояния клетки или присутствия молекул-предшественников.

#### ДЕГРАДАЦИЯ РНК КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ РАБОТЫ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

Бесспорно, контроль транскрипции и трансляции играет очень важную роль в регуляции генов. Кроме того, изменение времени жизни мРНК может сильно повлиять на продукцию белков. У бактерий стабильность мРНК регулируется несколькими рибонуклеазами и связанными с ними факторами, которые варьируются в зависимости от вида [76]. У *E. coli* и других грамотрицательных бактерий деградация РНК обычно начинается с внутреннего расщепления РНКазой E, за которым следует расщепление 3'-экзонуклеазой. У *B. subtilis* и других *Firmicutes* в деградации мРНК участвует другая эндонуклеаза – РНКаза Y и 5'-экзонуклеаза, РНКаза J. Вклад рибонуклеаз в механизмы рибопереклочения отмечен давно, но только недавние исследования показали, что деградация РНК может быть основным механизмом действия рибопереключателю [77, 78], а не только средством удаления РНК после завершения регуляторного ответа [79].

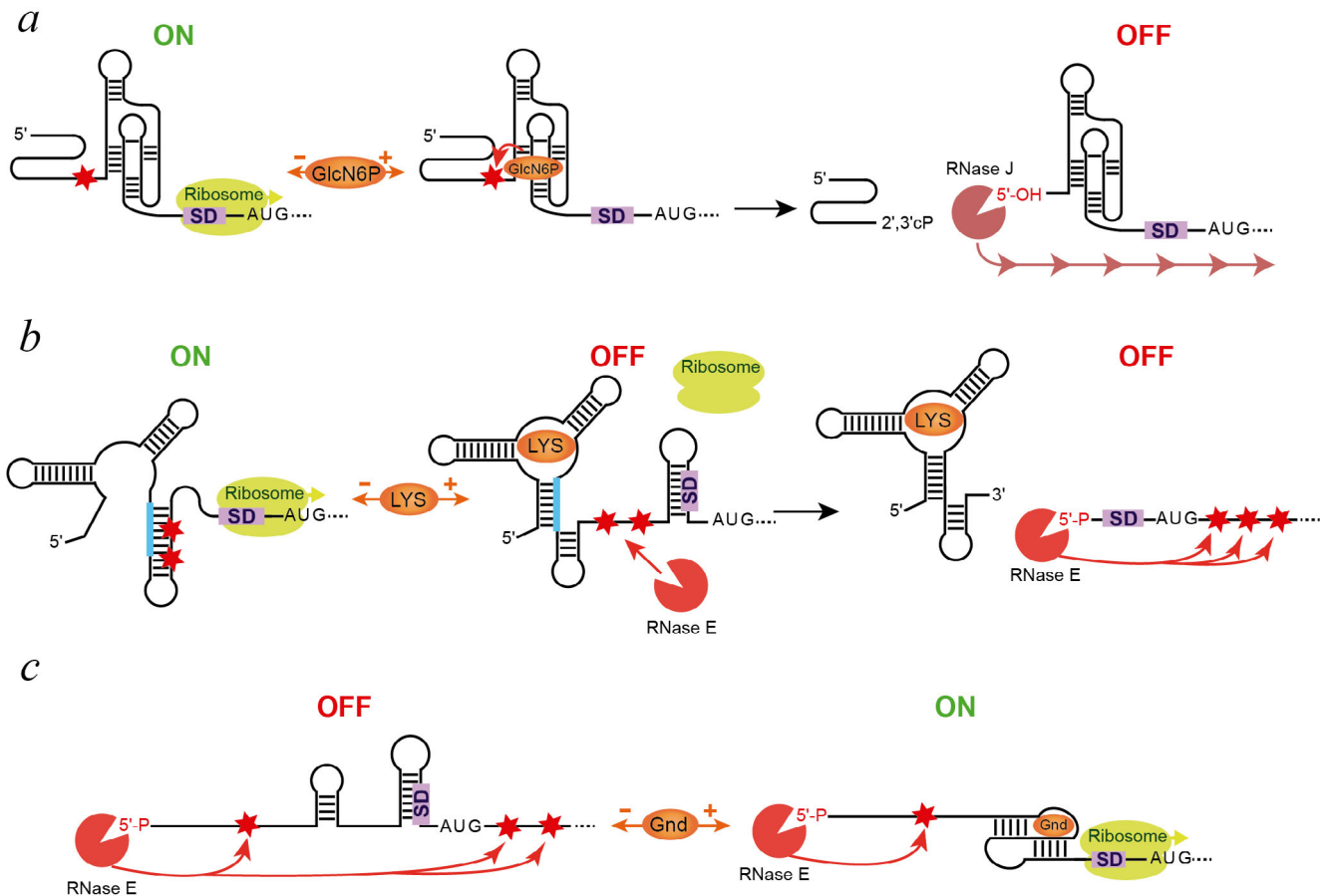
Первая взаимосвязь работы рибопереключателю и аппарата деградации РНК была установлена после открытия рибопереключателю рибозим *glmS* (рис. 5, a) [80, 81]. У *B. subtilis* мРНК *glmS* кодирует синтазу GlcN6P. При высоких концентрациях конечный продукт реакции, GlcN6P, инициирует регуляцию по принципу отрицательной обратной связи [80]. В от-

личие от других рибопереключателю, GlcN6P связывается с предварительно сформированным аптамером [82, 83] и вместо аллостерической модуляции его структуры катализирует реакцию расщепления мРНК перед аптамером [80, 84]. Полученный РНК-продукт больше не защищён трифосфатом на 5'-конце и подвергается быстрой деградации экзонуклеазой РНКазой J [81].

Следующий пример показывает другое участие РНКазы в механизме рибопереклочения [85]. После связывания лизина с сенсорным доменом лизинового рибопереключателю *lysC E. coli* платформа экспрессии сворачивается в шпильку, изолирующую SD-последовательность, которая выключает трансляцию и открывает два сайта расщепления РНКазой E, расположенные на платформе экспрессии (рис. 5, b). Эти расщепления приводят к образованию РНК с монофосфорилированным 5'-концом, которая, по-видимому, запускает ускоренную деградацию кодирующей области *lysC* РНКазой E. В отсутствие лизина рибопереключателю образует антисеквстрирующую SD-шпильку, которая также изолирует сайты расщепления РНКазой E, позволяя инициации трансляции происходить без деградации мРНК. Таким образом, лизиновый рибопереключателю является регулятором двойного действия: два разных механизма, подавление трансляции и деградация РНК, ингибируют экспрессию гена *lysC*. Подобное участие РНКазы может вносить вклад в генетические ответы других рибопереключателю [86].

В другой системе связывание метаболитов оказывает противоположный эффект на стабильность РНК [87, 88]. Цикло-ди-GMP-зависимый (c-di-GMP) рибопереключателю Vc2, по-видимому, подавляет экспрессию гена *Vibrio cholerae tfoY* в ответ на связывание лиганда путём изолирования SD-последовательности и ингибирования трансляции [88–90]. Связывание c-di-GMP с Vc2 также ведёт к накоплению вышележащих нетранслируемых РНК, которые, вероятно, функционируют как малые РНК (sRNA), контролирующие подвижность клеток [87]. Хотя молекулярная основа стабильности предполагаемых малых РНК неясна, стабилизация аптамера связанным c-di-GMP, вероятно, задействует 3'-конец при спаривании оснований и предотвращает доступ к нему 3'-экзонуклеаз.

Недавнее исследование элегантно продемонстрировало совершенно другой механизм, используемый рибопереключателю для регуляции экспрессии генов [78] (рис. 5, c). Этот механизм основан на нескольких открытиях, связан-



**Рис. 5.** Участие деградации РНК в ответе рибосwitchа. *a* – Механизм действия рибосwitchа рибозим *glmS* [80, 81]. В отсутствие GlcN6P ген транскрибируется и транслируется. Связывание GlcN6P вызывает расщепление (стрелка) в сайте (звездочка) перед аптамером. Экзонуклеаза РНКазы J связывается с дефосфорилированным 5'-концом и разрушает мРНК (линия со стрелками), выключая экспрессию гена. *b* – Двойной механизм лизинового рибосwitchа *lysC* *E. coli*, контролирующего инициацию трансляции и разрушение мРНК [85]. В отсутствие лизина рибосwitch сворачивается в состояние «ON», которое открывает SD-последовательность для инициации трансляции и изолирует сайт расщепления РНКазой E. После связывания лиганда домен аптамера принимает состояние «OFF», которое изолирует SD-последовательность и открывает сайт расщепления РНКазой E. РНКазы E начинают связываться с монофосфорилированным 5'-концом РНК и производить дальнейшие эндонуклеолитические расщепления (длинные стрелки) с последующим 3'-экзонуклеолитическим расщеплением (не показано). *c* – Участие деградации РНК в механизме рибосwitchа гуанидин-III *sugE* *Legionella pneumophila*. В отсутствие лиганда связанная с 5'-концом РНКазы E может производить эндонуклеолитические расщепления как перед аптамером, так и после него, поскольку свободный от лиганда рибосwitch не останавливает поиск сайтов расщепления по направлению от 5'- к 3'-концу. мРНК расщепляется, и белок не производится. Образование связанного с лигандом псевдоузла в домене аптамера высвобождает SD-последовательность для трансляции (не показана) и препятствует сканированию с помощью РНКазы E, предотвращая расщепление ниже аптамерного домена. Следовательно, связанный с лигандом аптамер защищает транслирующую рибосому от деградации, обеспечивая состояние «ON» экспрессии гена

ных с активностью РНКазы E. Эта эндорибонуклеаза разрезает РНК в определенных местах в одноцепочечных областях [91], и её активность значительно ускоряется после связывания с 5'-монофосфорилированной РНК через карман, специфичный для 5'-конца монофосфорилированной РНК [92, 93]. После связывания РНКазы E ищет сайты расщепления путём сканирования мРНК по направлению от 5'- к 3'-концу. Фермент обходит небольшие препят-

ствия, такие как стебли-петли с ортогональными парами оснований, но останавливается на более крупных препятствиях, таких как связанные белки или структуры, содержащие элементы с парами оснований, коаксиальные (имеющие общую ось) с направлением сканирования [78, 94]. Трансляция транскрипта *sugE* *Legionella pneumophila* контролируется рибосwitchа гуанидин-III. После связывания лиганда домен аптамера принимает компактную

структуру псевдоузла, в то время как SD-секвенирующая шпилька в платформе экспрессии разворачивается и освобождает SD-последовательность для связывания с рибосомами [78]. Кроме того, связанный с лигандом псевдоузел в аптамере представляет собой значительное препятствие для сканирования РНКазой E и защищает расположенные ниже сайты расщепления от доступа нуклеаз. В результате повышается стабильность мРНК *sugE*. Поскольку активность РНКазы E не зависит от контекста последовательности, этот механизм может быть общим для многих систем, использующих рибопереключателю, чьи связанные с лигандом аптамеры мешают сканированию.

### ПЕРСПЕКТИВЫ

Относительно простые механизмы работы рибопереключателю, обсуждаемые в этом обзоре, не дают полного представления обо всём многообразии этих механизмов. Опосредованный рибопереключателю контроль экспрессии генов может включать дополнительные уровни восприятия внешних факторов [95] или генерировать более сложные многокомпонентные регуляторные ответы с участием некодирующих РНК и белков [96, 97]. Учитывая, что биоинформационные поиски не выявили платформы экспрессии для многих предполагаемых рибопереключателю, мы можем ожидать, что в будущем будет обнаружено больше механизмов

рибопереключателю. Могут ли эти новые механизмы включать Rho-зависимую терминацию транскрипции, деградацию РНК или другие способы? Новые методологии, такие как RNA-Seq, уже идентифицировали множественные малые РНК, потенциально связанные с рибопереключателю [98–100]; следовательно, можно ожидать поток исследований, расшифровывающих связанные с малыми РНК механизмы рибопереключателю. Идентификация родственных лигандов для многих «сиротских» рибопереключателю и открытие новых классов рибопереключателю также обогатит репертуар механизмов работы рибопереключателю. Эти исследования дополнительно помогут нам понять регуляторные ответы и определить основных участников метаболических путей, а также создать молекулярную основу вмешательства в наиболее важные клеточные процессы патогенных бактерий.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом Фонда Рамона Аресеса (Ramon Ageses Foundation) (А.А.-М.) и грантом Национального института здравоохранения 2R01GM112940 (А.С.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** Эта статья не содержит исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McNerney, M. P., and Styczynski, M. P. (2018) Small molecule signaling, regulation, and potential applications in cellular therapeutics, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **10**, doi: 10.1002/wsbm.1405.
- Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015) Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 298–309, doi: 10.1038/nrmicro3448.
- Zimmermann, G. R., Jenison, R. D., Wick, C. L., Simorre, J. P., and Pardi, A. (1997) Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 644–649, doi: 10.1038/nsb0897-644.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., and Breaker, R. R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA, *Chem. Biol.*, **9**, 1043, doi: 10.1016/s1074-5521(02)00224-7.
- Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R. R. (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression, *Nature*, **419**, 952–956, doi: 10.1038/nature01145.
- Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., et al. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria, *Cell*, **111**, 747–756, doi: 10.1016/s0092-8674(02)01134-0.
- Nudler, E., and Mironov, A. S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 11–17, doi: 10.1016/j.tibs.2003.11.004.
- Pavlova, N., Kaloudas, D., and Penchovsky, R. (2019) Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria, *Gene*, **708**, 38–48, doi: 10.1016/j.gene.2019.05.036.
- Serganov, A., and Patel, D. J. (2012) Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function, *Annu. Rev. Biophys.*, **41**, 343–370, doi: 10.1146/annurev-biophys-101211-113224.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 75–117, doi: 10.1146/annurev.bi.53.070184.000451.
- Serganov, A., Ennifar, E., Portier, C., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (2002) Do mRNA and rRNA binding sites of *E. coli* ribosomal protein S15 share common structural determinants? *J. Mol. Biol.*, **320**, 963–978, doi: 10.1016/s0022-2836(02)00553-3.
- Cech, T. R., Zaug, A. J., and Grabowski, P. J. (1981) *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence, *Cell*, **27**, 487–496, doi: 10.1016/0092-8674(81)90390-1.
- Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818–822, doi: 10.1038/346818a0.

14. Robertson, D. L., and Joyce, G. F. (1990) Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*, **344**, 467–468, doi: 10.1038/344467a0.
15. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505–510, doi: 10.1126/science.2200121.
16. Yanofsky, C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons, *Nature*, **289**, 751–758, doi: 10.1038/289751a0.
17. Miranda-Rios, J., Navarro, M., and Soberon, M. (2001) A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9736–9741, doi: 10.1073/pnas.161168098.
18. Nou, X., and Kadner, R. J. (1998) Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **180**, 6719–6728, doi: 10.1128/JB.180.24.6719-6728.1998.
19. Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Jomantas, J., Kozlov, Y. I., and Perumov, D. A. (1999) A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes, *Trends Genet.*, **15**, 439–442, doi: 10.1016/s0168-9525(99)01856-9.
20. Perkins, J. B., and Pero, J. (2002) Biosynthesis of riboflavin, biotin, folic acid, and cobalamin, in *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.) ASM Press, Washington, pp. 271–286
21. Stormo, G. D., and Ji, Y. (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9465–9467, doi: 10.1073/pnas.181334498.
22. Ravnum, S., and Andersson, D. I. (2001) An adenosylcobalamin (coenzyme-B12)-repressed translational enhancer in the *cob* mRNA of *Salmonella typhimurium*, *Mol. Microbiol.*, **39**, 1585–1594, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02346.x.
23. Nou, X., and Kadner, R. J. (2000) Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7190–7195, doi: 10.1073/pnas.130013897.
24. Sudarsan, N., Barrick, J. E., and Breaker, R. R. (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes, *RNA*, **9**, 644–647, doi: 10.1261/rna.5090103.
25. Cheah, M. T., Wachter, A., Sudarsan, N., and Breaker, R. R. (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches, *Nature*, **447**, 497–500, doi: 10.1038/nature05769.
26. Bocobza, S. E., and Aharoni, A. (2008) Switching the light on plant riboswitches, *Trends Plant Sci.*, **13**, 526–533, doi: 10.1016/j.tplants.2008.07.004.
27. Wickiser, J. K., Winkler, W. C., Breaker, R. R., and Crothers, D. M. (2005) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch, *Mol. Cell.*, **18**, 49–60, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.032.
28. Smith, A. M., Fuchs, R. T., Grundy, F. J., and Henkin, T. M. (2010) The SAM-responsive S<sub>MK</sub> box is a reversible riboswitch, *Mol. Microbiol.*, **78**, 1393–1402, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07410.x.
29. Fuchs, R. T., Grundy, F. J., and Henkin, T. M. (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 226–233, doi: 10.1038/nsmb1059.
30. Lu, C., Smith, A. M., Fuchs, R. T., Ding, F., Rajashankar, K., et al. (2008) Crystal structures of the SAM-III/S<sub>MK</sub> riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1076–1083, doi: 10.1038/nsmb.1494.
31. Gilbert, S. D., Rambo, R. P., Van Tyne, D., and Batey, R. T. (2008) Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 177–182, doi: 10.1038/nsmb.1371.
32. Corbino, K. A., Barrick, J. E., Lim, J., Welz, R., Tucker, B. J., et al. (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria, *Genome Biol.*, **6**, R70, doi: 10.1186/gb-2005-6-8-r70.
33. Panchapakesan, S. S. S., Corey, L., Malkowski, S. N., Higgs, G., and Breaker, R. R. (2021) A second riboswitch class for the enzyme cofactor NAD<sup>+</sup>, *RNA*, **27**, 99–105, doi: 10.1261/rna.077891.120.
34. Salvail, H., Balaji, A., Yu, D., Roth, A., and Breaker, R. R. (2020) Biochemical validation of a fourth guanidine riboswitch class in Bacteria, *Biochemistry*, **59**, 4654–4662, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00793.
35. Atilho, R. M., Mirihana Arachchilage, G., Greenlee, E. B., Knecht, K. M., and Breaker, R. R. (2019) A bacterial riboswitch class for the thiamin precursor HMP-PP employs a terminator-embedded aptamer, *Elife*, **8**, doi: 10.7554/eLife.45210.
36. Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., et al. (2012) Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5376–5381, doi: 10.1073/pnas.1112211109.
37. Peters, J. M., Mooney, R. A., Kuan, P. F., Rowland, J. L., Keles, S., and Landick, R. (2009) Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15406–15411, doi: 10.1073/pnas.0903846106.
38. Dann, C. E., 3rd, Wakeman, C. A., Sieling, C. L., Baker, S. C., Irnov, I., and Winkler, W. C. (2007) Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA, *Cell*, **130**, 878–892, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.051.
39. Wakeman, C. A., Ramesh, A., and Winkler, W. C. (2009) Multiple metal-binding cores are required for metalloregulation by M-box riboswitch RNAs, *J. Mol. Biol.*, **392**, 723–735, doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.033.
40. Furukawa, K., Ramesh, A., Zhou, Z., Weinberg, Z., Vallery, T., et al. (2015) Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> ions and control expression of heavy metal transporters, *Mol. Cell*, **57**, 1088–1098, doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.009.
41. Xu, J., and Cotruvo, J. A., Jr. (2020) The *czcD* (NiCo) riboswitch responds to Iron(II), *Biochemistry*, **59**, 1508–1516, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00074.
42. Price, I. R., Gaballa, A., Ding, F., Helmann, J. D., and Ke, A. (2015) Mn<sup>2+</sup>-sensing mechanisms of *yybP-ykoY* orphan riboswitches, *Mol. Cell*, **57**, 1110–1123, doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.016.
43. Trausch, J. J., Ceres, P., Reyes, F. E., and Batey, R. T. (2011) The structure of a tetrahydrofolate-sensing riboswitch reveals two ligand binding sites in a single aptamer, *Structure*, **19**, 1413–1423, doi: 10.1016/j.str.2011.06.019.
44. Gao, A., and Serganov, A. (2014) Structural insights into recognition of c-di-AMP by the *ydaO* riboswitch, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 787–792, doi: 10.1038/nchembio.1607.
45. Ren, A., and Patel, D. J. (2014) c-di-AMP binds the *ydaO* riboswitch in two pseudo-symmetry-related pockets, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 780–786, doi: 10.1038/nchembio.1606.
46. Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A. T., Breaker, R. R., and Patel, D. J. (2006) Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch, *Nature*, **441**, 1167–1171, doi: 10.1038/nature04740.
47. Serganov, A., Huang, L., and Patel, D. J. (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch, *Nature*, **458**, 233–237, doi: 10.1038/nature07642.
48. Edwards, T. E., and Ferre-D'Amare, A. R. (2006) Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition, *Structure*, **14**, 1459–1468, doi: 10.1016/j.str.2006.07.008.

49. Ren, A., Rajashankar, K. R., and Patel, D. J. (2012) Fluoride ion encapsulation by Mg<sup>2+</sup> ions and phosphates in a fluoride riboswitch, *Nature*, **486**, 85-89, doi: 10.1038/nature11152.
50. Serganov, A., Huang, L., and Patel, D. J. (2008) Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch, *Nature*, **455**, 1263-1267, doi: 10.1038/nature07326.
51. Huang, L., Serganov, A., and Patel, D. J. (2010) Structural insights into ligand recognition by a sensing domain of the cooperative glycine riboswitch, *Mol. Cell*, **40**, 774-786, doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.026.
52. McCluskey, K., Boudreault, J., St-Pierre, P., Perez-Gonzalez, C., Chauvier, A., et al. (2019) Unprecedented tunability of riboswitch structure and regulatory function by sub-millimolar variations in physiological Mg<sup>2+</sup>, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6478-6487, doi: 10.1093/nar/gkz316.
53. Watson, P. Y., and Fedor, M. J. (2011) The *glmS* riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites *in vivo*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 359-363, doi: 10.1038/nsmb.1989.
54. Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., et al. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression, *Science*, **306**, 275-279, doi: 10.1126/science.1100829.
55. Butler, E. B., Xiong, Y., Wang, J., and Strobel, S. A. (2011) Structural basis of cooperative ligand binding by the glycine riboswitch, *Chem. Biol.*, **18**, 293-298, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.01.013.
56. Sherman, E. M., Esquiaqui, J., Elsayed, G., and Ye, J. D. (2012) An energetically beneficial leader-linker interaction abolishes ligand-binding cooperativity in glycine riboswitches, *RNA*, **18**, 496-507, doi: 10.1261/rna.031286.111.
57. Torgerson, C. D., Hiller, D. A., and Strobel, S. A. (2020) The asymmetry and cooperativity of tandem glycine riboswitch aptamers, *RNA*, **26**, 564-580, doi: 10.1261/rna.073577.119.
58. Ames, T. D., and Breaker, R. R. (2011) Bacterial aptamers that selectively bind glutamine, *RNA Biol.*, **8**, 82-89, doi: 10.4161/rna.8.1.13864.
59. Ren, A., Xue, Y., Peselis, A., Serganov, A., Al-Hashimi, H. M., and Patel, D. J. (2015) Structural and dynamic basis for low-affinity, high-selectivity binding of L-glutamine by the glutamine riboswitch, *Cell Rep.*, **13**, 1800-1813, doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.062.
60. Sherlock, M. E., Malkowski, S. N., and Breaker, R. R. (2017) Biochemical validation of a second guanidine riboswitch class in Bacteria, *Biochemistry*, **56**, 352-358, doi: 10.1021/acs.biochem.6b01270.
61. Huang, L., Wang, J., and Lilley, D. M. J. (2017) The structure of the guanidine-II riboswitch, *Cell. Chem. Biol.*, **24**, 695-702.e2, doi: 10.1016/j.chembiol.2017.05.014.
62. Reiss, C. W., and Strobel, S. A. (2017) Structural basis for ligand binding to the guanidine-II riboswitch, *RNA*, **23**, 1338-1343, doi: 10.1261/rna.061804.117.
63. Wuebben, C., Vicino, M. F., Mueller, M., and Schiemann, O. (2020) Do the P1 and P2 hairpins of the Guanidine-II riboswitch interact? *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10518-10526, doi: 10.1093/nar/gkaa703.
64. Malkowski, S. N., Spencer, T. C. J., and Breaker, R. R. (2019) Evidence that the *nadA* motif is a bacterial riboswitch for the ubiquitous enzyme cofactor NAD<sup>+</sup>, *RNA*, **25**, 1616-1627, doi: 10.1261/rna.072538.119.
65. Huang, L., Wang, J., and Lilley, D. M. J. (2020) Structure and ligand binding of the ADP-binding domain of the NAD<sup>+</sup> riboswitch, *RNA*, **26**, 878-887, doi: 10.1261/rna.074898.120.
66. Chen, H., Egger, M., Xu, X., Flemmich, L., Krasheninina, O., et al. (2020) Structural distinctions between NAD<sup>+</sup> riboswitch domains 1 and 2 determine differential folding and ligand binding, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12394-12406, doi: 10.1093/nar/gkaa1029.
67. Tang, D. J., Du, X., Shi, Q., Zhang, J. L., He, Y. P., et al. (2020) A SAM-I riboswitch with the ability to sense and respond to uncharged initiator tRNA, *Nat. Commun.*, **11**, 2794, doi: 10.1038/s41467-020-16417-z.
68. Sherlock, M. E., Sudarsan, N., Stav, S., and Breaker, R. R. (2018) Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.33908.
69. Peselis, A., and Serganov, A. (2018) *ykkC* riboswitches employ an add-on helix to adjust specificity for polyanionic ligands, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 887-894, doi: 10.1038/s41589-018-0114-4.
70. Knappenberger, A. J., Reiss, C. W., and Strobel, S. A. (2018) Structures of two aptamers with differing ligand specificity reveal ruggedness in the functional landscape of RNA, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.36381.
71. Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N., and Breaker, R. R. (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger, *Science*, **329**, 845-848, doi: 10.1126/science.1190713.
72. Chen, A. G., Sudarsan, N., and Breaker, R. R. (2011) Mechanism for gene control by a natural allosteric group I ribozyme, *RNA*, **17**, 1967-1972, doi: 10.1261/rna.275731.1.
73. Sudarsan, N., Hammond, M. C., Block, K. F., Welz, R., Barrick, J. E., et al. (2006) Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions, *Science*, **314**, 300-304, doi: 10.1126/science.1130716.
74. Stoddard, C. D., and Batey, R. T. (2006) Mix-and-match riboswitches, *ACS Chem. Biol.*, **1**, 751-754, doi: 10.1021/cb600458w.
75. Stav, S., Atilho, R. M., Mirihana Arachchilage, G., Nguyen, G., Higgs, G., and Breaker, R. R. (2019) Genome-wide discovery of structured noncoding RNAs in bacteria, *BMC Microbiol.*, **19**, 66, doi: 10.1186/s12866-019-1433-7.
76. Hui, M. P., Foley, P. L., and Belasco, J. G. (2014) Messenger RNA degradation in bacterial cells, *Annu. Rev. Genet.*, **48**, 537-559, doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092340.
77. Richards, J., and Belasco, J. G. (2021) Riboswitch control of bacterial RNA stability, *Mol. Microbiol.*, doi: 10.1111/mmi.14723.
78. Richards, J., and Belasco, J. G. (2021) Widespread protection of RNA cleavage sites by a riboswitch aptamer that folds as a compact obstacle to scanning by RNase E, *Mol. Cell*, **81**, 127-138.e124, doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.025.
79. Shahbadian, K., Jamalli, A., Zig, L., and Putzer, H. (2009) RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*, *EMBO J.*, **28**, 3523-3533, doi: 10.1038/emboj.2009.283.
80. Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., and Breaker, R. R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme, *Nature*, **428**, 281-286, doi: 10.1038/nature02362.
81. Collins, J. A., Irnov, I., Baker, S., and Winkler, W. C. (2007) Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme, *Genes Dev.*, **21**, 3356-3368, doi: 10.1101/gad.1605307.
82. Klein, D. J., and Ferre-D'Amare, A. R. (2006) Structural basis of *glmS* ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate, *Science*, **313**, 1752-1756, doi: 10.1126/science.1129666.
83. Cochrane, J. C., Lipchock, S. V., and Strobel, S. A. (2007) Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to its catalytic cofactor, *Chem. Biol.*, **14**, 97-105, doi: 10.1016/j.chembiol.2006.12.005.
84. Davis, J. H., Dunican, B. F., and Strobel, S. A. (2011) *glmS* Riboswitch binding to the glucosamine-6-phosphate alpha-anomer shifts the pK<sub>a</sub> toward neutrality, *Biochemistry*, **50**, 7236-7242, doi: 10.1021/bi200471c.
85. Caron, M. P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Masse, E., and Lafontaine, D. A. (2012) Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E3444-3453, doi: 10.1073/pnas.1214024109.

86. Takemoto, N., Tanaka, Y., and Inui, M. (2015) Rho and RNase play a central role in FMN riboswitch regulation in *Corynebacterium glutamicum*, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 520-529, doi: 10.1093/nar/gku1281.
87. Pursley, B. R., Fernandez, N. L., Severin, G. B., and Waters, C. M. (2019) The Vc2 cyclic di-GMP-dependent riboswitch of *Vibrio cholerae* regulates expression of an upstream putative small RNA by controlling RNA stability, *J. Bacteriol.*, **201**, doi: 10.1128/JB.00293-19.
88. Pursley, B. R., Maiden, M. M., Hsieh, M. L., Fernandez, N. L., Severin, G. B., and Waters, C. M. (2018) Cyclic di-GMP regulates TfoY in *Vibrio cholerae* to control motility by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *J. Bacteriol.*, **200**, doi: 10.1128/JB.00578-17.
89. Inuzuka, S., Nishimura, K., Kakizawa, H., Fujita, Y., Furuta, H., et al. (2016) Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism, *J. Biochem.*, **160**, 153-162, doi: 10.1093/jb/mvw026.
90. Inuzuka, S., Kakizawa, H., Nishimura, K. I., Naito, T., Miyazaki, K., et al. (2018) Recognition of cyclic-di-GMP by a riboswitch conducts translational repression through masking the ribosome-binding site distant from the aptamer domain, *Genes Cells*, **23**, 435-447, doi: 10.1111/gtc.12586.
91. Kaberdin, V. R. (2003) Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4710-4716, doi: 10.1093/nar/gkg690.
92. Mackie, G. A. (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease, *Nature*, **395**, 720-723, doi: 10.1038/27246.
93. Callaghan, A. J., Marcaida, M. J., Stead, J. A., McDowall, K. J., Scott, W. G., and Luisi, B. F. (2005) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover, *Nature*, **437**, 1187-1191, doi: 10.1038/nature04084.
94. Richards, J., and Belasco, J. G. (2019) Obstacles to scanning by RNase E govern bacterial mRNA lifetimes by hindering access to distal cleavage sites, *Mol. Cell*, **74**, 284-295.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2019.01.044.
95. Reining, A., Nozinovic, S., Schlepckow, K., Buhr, F., Furtig, B., and Schwalbe, H. (2013) Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches, *Nature*, **499**, 355-359, doi: 10.1038/nature12378.
96. Mellin, J. R., Koutero, M., Dar, D., Nahori, M. A., Sorek, R., and Cossart, P. (2014) Sequestration of a two-component response regulator by a riboswitch-regulated noncoding RNA, *Science*, **345**, 940-943, doi: 10.1126/science.1255083.
97. DeRoy, S., Gebbie, M., Ramesh, A., Goodson, J. R., Cruz, M. R., et al. (2014) A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator, *Science*, **345**, 937-940, doi: 10.1126/science.1255091.
98. Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., and Sorek, R. (2013) A global transcriptional switch between the attack and growth forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*, *PLoS One*, **8**, e61850, doi: 10.1371/journal.pone.0061850.
99. Weber, L., Thoenen, C., Volk, M., Remes, B., Lechner, M., and Klug, G. (2016) The conserved Dcw gene cluster of *R. sphaeroides* is preceded by an uncommonly extended 5' leader featuring the sRNA UpsM, *PLoS One*, **11**, e0165694, doi: 10.1371/journal.pone.0165694.
100. Soutourina, O. A., Monot, M., Boudry, P., Saujet, L., Pichon, C., et al. (2013) Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*, *PLoS Genet.*, **9**, e1003493, doi: 10.1371/journal.pgen.1003493.
101. Haller, A., Rieder, U., Aigner, M., Blanchard, S. C., and Micura, R. (2011) Conformational capture of the SAM-II riboswitch, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 393-400, doi: 10.1038/nchembio.562.
102. Nelson, J. W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J. X., and Breaker, R. R. (2013) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 834-839, doi: 10.1038/nchembio.1363.

## RIBOSWITCH MECHANISMS: NEW TRICKS FOR AN OLD DOG

### Review

A. Ariza-Mateos, A. Nuthanakanti, and A. Serganov\*

*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University Grossman School of Medicine, New York, New York 10016, USA; e-mail: alexander.serganov@nyulangone.org*

Discovered almost twenty years ago, riboswitches turned out to be one of the most broadly spread regulatory systems in bacteria, with representatives found in eukaryotes and archaea. Unlike many other regulatory elements, riboswitches are entirely composed of RNA and capable of modulating expression of genes by direct binding of small cellular molecules. While bacterial riboswitches were initially thought to control production of enzymes and transporters associated with small organic molecules via feedback regulatory circuits, later findings identified riboswitches directing expression of a wide range of genes and responding to various classes of molecules, including ions, signaling molecules, and others. The 5'-untranslated mRNA regions host the vast majority of riboswitches, which modulate transcription or translation of downstream genes through conformational rearrangements in the ligand-sensing domains and adjacent expression-controlling platforms. Over years, the repertoire of the regulatory mechanisms employed by riboswitches has greatly expanded and most recent studies highlighted the importance of alternative mechanisms, such as RNA degradation, for riboswitch-mediated genetic circuits. This review discusses the plethora of bacterial riboswitch mechanisms and illustrates how riboswitches utilize different features and approaches to elicit various regulatory responses.

**Keywords:** riboswitch, transcription, translation, mRNA, metabolite