

Розподіл шпилькових структур у плазмідах збудника сибірської виразки

О. Ю. Лиманська^{1,2}, О. П. Лиманський¹

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України»
Вул. Пушкінська, 14, Харків, Україна, 61057

²Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
Вул. Пушкінська, 83, Харків, Україна, 61023

olga.limanskaya@mail.ru

*Однією з важливих біологічних функцій шпилькових структур є захист РНК-транскриптів від деградувальної дії різних факторів, а також регуляція транскрипції за рахунок їхнього формування у термінаторах транскрипції. Проведено пошук та визначено розподіли термодинамічно стабільних досконалих і недосконалих інвертованих повторів у плазмідах рХО1 і рХО2 патогенних штамів *Bacillus anthracis*. Аналіз послідовностей плазмід рХО1 і рХО2 *B. anthracis* виявив, що перша містить 176 інвертованих послідовностей з енергією від $-30,6$ до $-10,0$ ккал/моль, а друга – 57 шпильок з енергією від $-27,2$ до $-10,0$ ккал/моль. Представлено фізичні карти плазмід рХО1 і рХО2 з локалізованими шпильковими структурами. Показано, що останні на фізичних картах плазмід рХО1 і рХО2 розташовані в ділянці регуляторних генів або в елементах з невизначеною функцією.*

*Ключові слова: *Bacillus anthracis*, шпилькова структура, інвертований повтор, хрестоподібна структура.*

Вступ. На сьогодні основні зусилля вчених, що працюють у галузі геноміки, направлено на розробку ефективних засобів аналізу генетичних «текстів» – послідовностей нуклеотидів геному організму. Комп'ютерний аналіз є важливим методом дослідження ДНК. Вивчення генетичного тексту передбачає встановлення можливих функцій різних фрагментів послідовності ДНК: пошук генів, регуляторних сайтів тощо. У наш час точність визначення генів комп'ютерними методами на відомій нуклеотидній послідовності не перевищує 70 % [1].

Дотепер геноміка – наукова дисципліна, що недавно з'явилася, перебуває в описовому стані, рухаючись за технічним прогресом. Секвенування геномів призвело до розширення та поглиблення на-

шого розуміння генетичної інформації. Ще відносно недавно поняття геному було доволі абстрактним. Наразі вважають, що найважливішими складовими частинами геному є екзон (який становить лише 1 % усього геному), інтрон, метилом, транскриптом (набір усіх РНК-транскриптів, які синтезуються в клітині або популяції клітин), варіом (повний набір генетичних варіацій, характерних для виду, або сума поліморфізмів поодиноких нуклеотидів) [2, 3].

Консервативні ділянки геному, які не кодують білки, мають важливі функції в еу- та прокариотів. Встановлено, що вони є джерелом сенсових і антисенсових некодуючих РНК різних варіантів інтронів, що утворюють інтрон (інколи інтрони можуть функціонувати як екзони, а екзони – як інтрони). Накопичення даних щодо інтрону мікроор-

ганізмів дозволить ідентифікувати біологічно значущі властивості, які регулюються інтронами.

Відомо, що функціонування кожного гена залежить від багатьох факторів. Проте є думки, що загальна кількість елементарних регулюючих факторів (які кодуються одним геном) повинна бути істотно меншою, ніж загальна кількість генів. Незначна частина (порівняно із загальним числом генів) елементарних факторів може забезпечити регуляцію суттєвої кількості генів. У секвенованих послідовностях геномів еукаріотів та прокаріотів знаходиться великий об'єм інформації, пов'язаної з їхньою молекулярною генетикою. Для отримання цієї інформації розробляють підходи для вирішення різноманітних задач геноміки. Досить значну увагу приділяють пошуку повторів, оскільки вони становлять істотну частку геному. Зокрема, у геномі людини міститься понад 50 % повторів. Деякі класи останніх відіграють важливу структурну і функціональну роль. З іншого боку, пошук повторів є нетривіальною задачею.

Bacillus anthracis – це велика паличкоподібна грампозитивна аеробна бактерія, яка є етіологічним агентом сибірської виразки, небезпечного, а часом і фатального захворювання людини й тварин. Вона належить до групи бацил *B. cereus*, куди входять також *B. thuringiensis*, *B. cereus* і *B. mycoides*. Ці близькоспоріднені бактерії є патогенами тварин (*B. anthracis* і *B. cereus*) та комах (*B. thuringiensis*). Від інших членів групи *B. anthracis* відрізняється наявністю мегаплазмід *pXO1* і *pXO2*, що кодують синтез токсинів і капсули відповідно та обумовлюють вірулентність бацили. Відомо, що існують ізоляти *B. anthracis*, у яких відсутні одна або обидві плазмиди. Крім того, можливим є перенесення плазмід серед споріднених видів або втрата плазмиди *pXO2* природним шляхом [4]. Також є дані про успішне перенесення плазмиди *pXO2* в інші бацили та експресію генів токсинів, таких як *lef1* і *суа*, у гетерологічних системах [5]. Відсутність будь-якої з плазмід призводить до втрати патогенних властивостей штаму *B. anthracis* [6].

Цікавість до можливості утворення шпилькових структур виникла у зв'язку з тим, що вони є одним із факторів, які регулюють стабільність мРНК мікроорганізмів [7, 8].

На сучасному етапі розвитку науки секвенування геному дозволяє дізнатися тільки про порядок розташування нуклеотидів. Щоб зрозуміти сенс послідовності нуклеотидів, необхідна ідентифікація не лише кодуючих, але й регуляторних послідовностей. Знання ж тільки послідовності «літер» не дозволяє зрозуміти зміст усього «тексту» геному.

Раніше для двох ізолятів мікобактерій туберкульозу, що повільно ростуть, з повністю секвенованими геномами (H37Rv і CDC1551) визначено розподіл термодинамічно стабільних досконалих інвертованих повторів [9]. Незважаючи на високий ступінь гомології (понад 90 %) геномів цих ізолятів мікобактерій, вони характеризуються різним рівнем вірулентності: H37Rv є лабораторним штамом, а клінічний ізолят CDC1551 має високий рівень вірулентності. Нами показано, що обидва ізоляти містять по вісім довгих інвертованих повторів довжиною 48–62 нуклеотиди (н.), з яких шість шпильок повністю збігаються. У той же час у геномі CDC1551 (на відміну від H37Rv) на 5'-кінці матричного ланцюга ДНК локалізована високостабільна шпилька довжиною 58 н. [9]. Припускається, що локалізація високостабільної шпильки з $G = -53,9$ ккал/моль в області 5'-кінця ДНК ізоляту CDC1551 може призводити до різного ступеня стабілізації РНК-транскриптів або різної ефективності термінації транскрипції РНК-полімерази штаму CDC1551 порівняно з ізолятом H37Rv. Це, в свою чергу, незважаючи на подібність фізичних карт геномів двох ізолятів, може слугувати однією з причин різної вірулентності штамів.

Інвертовані повтори також можуть бути сайтами впізнання для рекомбіназ. Наявність інвертованих повторів, очевидно, свідчить про імовірність перенесення послідовностей ДНК між повторами внаслідок транскрипції або рекомбінації [10]. Однією з важливих біологічних функцій шпильок може бути захист РНК-транскриптів плазмід, що обумовлюють вірулентність *B. anthracis*, від деградативної активності різних факторів. Зазначимо, що інформація про розподіл інвертованих повторів у геномах мікроорганізмів взагалі та в геномі *B. anthracis* зокрема у доступній літературі відсутня. У цій роботі на основі комп'ютерного аналізу охаракте-

Таблиця 1

Термодинамічно стабільні шпилькові структури, потенційно утворені інвертованими повторами, для плазмід *pXO1* патогенного штаму *Bacillus anthracis*

Довжина стебла, п. н.	Довжина петлі, н.	Енергія, ккал/моль	Положення на плазміді
18	12	-21,5	24754-24801
20	8	-23,9	24990-25038
19	4	-22,9	26110-26131
18	4	-28,3	26553-26592
21	10	-20,7	42014-42065
25	12	-22,5	48010-48071
24	18	-30,6	55825-55890
19	3	-21,9	60528-60568
20	7	-28	63955-64001
13	5	-22,9	71398-71428
20	5	-30,5	72274-72318
21	8	-29,8	100450-10049
23	5	-25	105993-10604
16	5	-21,7	109971-11000
22	3	-21	114805-114851
20	13	-29,7	120940-120991
24	8	-21,2	121312-121367
24	4	-24,3	136336-136387
19	4	-21,7	137579-137620
22	3	-25,3	146102-146148
25	3	-21,4	148426-148478
18	4	-23	153484-153522
18	3	-25	159742-159782
20	3	-20,5	162053-162095
14	4	-21	169071-169102
17	17	-24,1	172043-172093
18	9	-29,3	179421-179465

Примітка. Жирним шрифтом виділено досконалі шпильки.

ризвано термодинамічно стабільні досконалі та недосконалі інвертовані повтори, які утворюють шпилькові структури, або шпильки, що можуть ви-

никати в плазмідах *pXO1* і *pXO2* патогенних штамів *B. anthracis*, та представлено фізичні карти плазмід з локалізованими шпильковими структурами.

Матеріали і методи. Використано послідовності повністю секвенованих ізолятів плазмід *pXO2* (номер АЕ 011191(NC 003981), 94829 п. н.) і плазмід *pXO1* (номер АЕ 065504, 181654 п. н.). Для пошуку досконалих інвертованих повторів та визначення їхніх термодинамічних характеристик застосовано програму Oligo (версія 3.4) [11]. Пошук недосконалих інвертованих повторів та визначення їхніх параметрів здійснено за допомогою програми RNA 2 пакета GeneBee [12]. Повні послідовності плазмід *pXO1* і *pXO2*, отримані з бази даних GenBank, було розрізано на фрагменти довжиною 14000 п. н., оскільки програмні пакети, використані в даній роботі, дозволяють аналізувати послідовності, довжина яких не перевищує 15000 п. н.

Результати і обговорення. Повтори можуть бути прямими та інвертованими, досконалими (повний збіг їхніх послідовностей) або недосконалими (містять нуклеотиди, які не збігаються). Інвертовані повтори у складі молекул РНК і ДНК можуть перебувати у двох різних конформаційних станах – або у вигляді одноланцюгової чи дволанцюгової спіралі відповідно, або набувати шпилькоподібної структури, яка складається з дволанцюгового стебла та одноланцюгової петлі. Раніше для суперспіральних ДНК, послідовності яких містять інвертовані повтори (паліндроми), встановлено, що за фізіологічних умов можливе утворення шпильок як фрагментів хрестоподібної структури з довжиною стебла не менше 7 п. н. та петлею, розмір якої не перевищує 4–5 н. [13–15]. Виходячи з цих параметрів, ми визначили термодинамічно стабільні досконалі інвертовані повтори як у послідовності плазмід *pXO1* (табл. 1), так і в послідовності плазмід *pXO2* патогенного штаму А2012 *B. anthracis* (табл. 2).

Комп'ютерний аналіз показав, що плазмід *pXO1* містить 67 шпилькових структур з петлею, розмір якої не перевищує 5 н. (рис. 1). З них 11 шпильок характеризуються енергією ($-G$) понад 20 ккал/моль (табл. 1). Цікаво, що в плазміді *pXO1* виявлено чотири досконалих інвертованих повтори з високим значенням $-G$ (понад 20 ккал/моль) та

Таблиця 2
Термодинамічно стабільні шпилькові структури, потенційно утворені інвертованими повторами, для плазміди *pXO2* патогенного штаму *Bacillus anthracis*

Довжина стебла, п. н.	Довжина петлі, н.	Енергія, ккал/моль	Положення на плазміді
20	9	-20,0	13585–13634
17	4	-24,3	29190–29227
22	7	-27,2	37712–37762
20	6	-21,2	44958–45003
20	11	-27,1	48478–48528
20	8	-22,4	59914–59961

Примітка. Жирним шрифтом виділено досконалі шпильки.

петлею 8–13 н. (позиції 5, 11, 12, 27 у табл. 1). На нашу думку, наявність таких досконалих інвертованих повторів з високим значенням енергії свідчить про можливість існування *in vivo* шпильок з петлями, розмір яких становить 8–13 н.

Паліндроми, які потенційно здатні утворювати шпильки за рахунок міжланцюгового комплементарного спарювання нуклеотидів в одноланцюговій ДНК і РНК, умовно можна розділити на довгі та короткі (більше і менше 45 н. відповідно) повтори. Плазмідна *pXO1* може містити 17 довгих паліндромів довжиною 45–66 н. з *G* від -30,6 до -20,7 ккал/моль та 10 коротких паліндромів довжиною 31–43 н. з *G* від -20,5 до -30,6 ккал/моль (табл. 1). Варто підкреслити, що переважна більшість шпилькових структур на фізичній карті плазміди *pXO1* локалізована в області регуляторних генів або в елементах з невизначеною функцією (рис. 1, б). Це підтверджує відомі літературні дані щодо наявності хрестоподібних структур у регуляторних фрагментах, зокрема, у багатьох термінаторах транскрипції [16].

Плазмідна *pXO2* може включати 25 шпилькових структур з петлею до 5 н. (рис. 2). Крім того, є два довгих досконалих інвертованих повтори з петлею понад 5 н. та - *G* понад 20 ккал/моль (позиції 4, 5 у табл. 2).

На відміну від плазміди *pXO1* плазмідна *pXO2* не містить жодного довгого паліндрома з петлею до

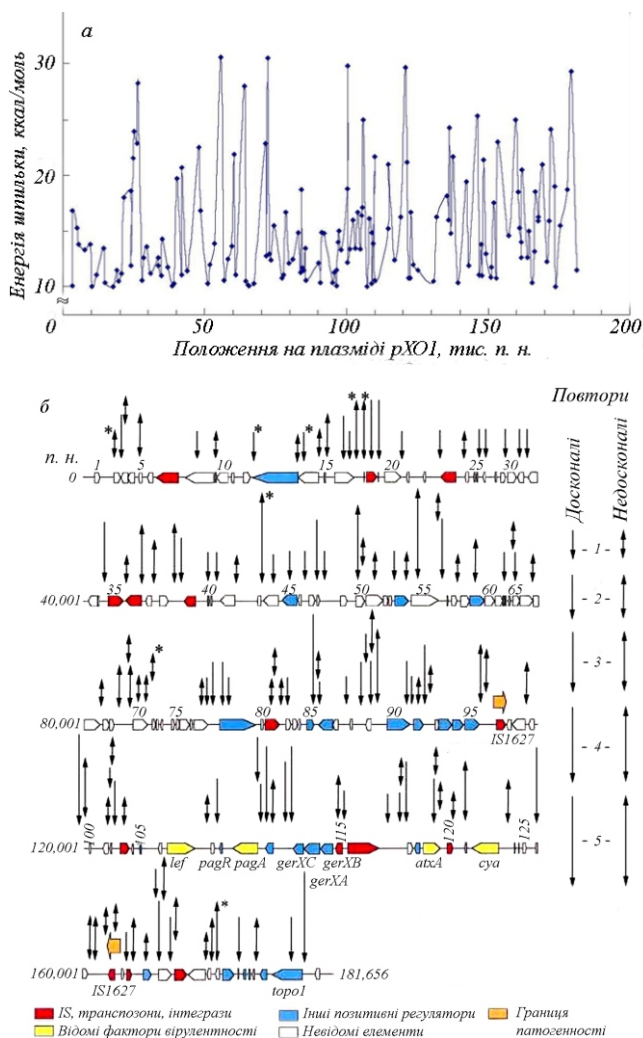


Рис. 1. Гістограма розподілу можливих шпилькових структур на плазміді *pXO1* (довжина 181654 п. н.) збудника сибірської виразки (а) та фізична карта плазміди *pXO1 Bacillus anthracis* [17] (б). Наведено позиції відомих генів токсинів, елементів IS1623, а також очікувані позиції 143 відкритих рамок зчитування (показано цифрами). Гени, що кодують: *lef* – ендопептидазу летального фактора; *суа* (calmodulin-sensitive adenylate cyclase) – чутливу до кальмодуліну аденіциклазу; *pagA* – захисний антиген; *тоpo I* – топоізомераза I; *gerXA*, *gerXB* – розвіток спори; *atxA* – позитивний трансрегулятор експресії токсичної виразки; *pagR* – транскрипційний репресор. Стрілками вказано позиції визначених термодинамічно стабільних досконалих і недосконалих шпилькових структур; зірочкою позначено шпилькові структури, довжина петлі яких перевищує 12 н.; шпильки з енергією понад: 1–10; 2–15; 3–20; 4–25; 5–30 ккал/моль

5 н., а також жодного досконалого короткого паліндрома з - *G* понад 20 ккал/моль (табл. 2). На рис. 2, б, представлено фізичну карту плазміди *pXO2* з позиціями знайдених шпилькових структур.

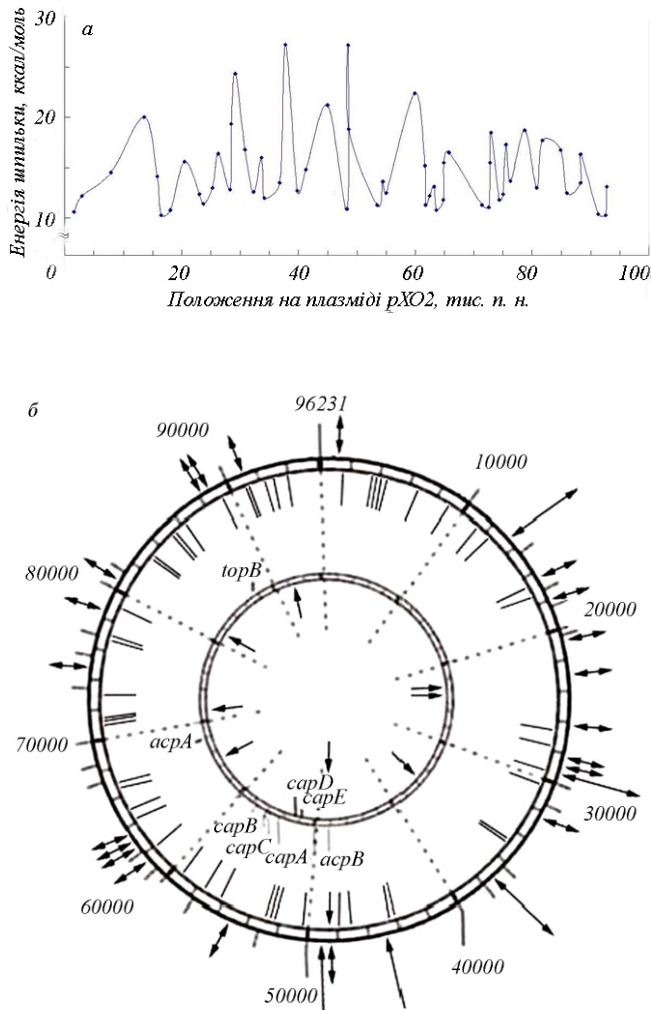


Рис. 2. Гістограма розподілу можливих шпилькових структур на плазміді *pXO2* (довжина 94829 п. н.) збудника сибірської виразки (а) та фізична карта плазміді *pXO2 V. anthracis* (номер AF188935, довжина 96231 п. н.) (б). Положення відомих вірулентних генів (*capA*, *capB*, *capC*, *capD*, *capE*, *topB*) та позитивних трансрегуляторів (*aspA*, *aspB*) представлено у внутрішньому колі. Стрілками вказано позиції потенційних досконалих і недосконалих шпилькових структур, довжина петлі яких не перевищує 12 н. Інші позначення: «—» – недосконалі та досконалі шпильки з енергією до 10 ккал/моль та петлею до 8 нуклеотидів; «>>» – досконалі шпильки з енергією понад 10 ккал/моль; «-» – досконалі шпильки з енергією понад 20 ккал/моль; «>>>» – недосконалі шпильки з енергією понад 10 ккал/моль; «>>>>» – недосконалі шпильки з енергією понад 20 ккал/моль

Зазначимо, що наразі функції більшості генів плазміді *pXO2* ще не встановлено, і тому отримані дані можна буде проаналізувати після встановлен-

ня функцій генів плазміді *pXO2*. Наведені результати демонструють, що досконалі та недосконалі інвертовані повтори є високостабільними генетичними елементами як для плазміді *pXO1*, так і для плазміді *pXO2*. Проведений аналіз потенційно можливих вторинних структур дозволяє припустити, що одна з біологічних функцій згаданих шпильок полягає в захисті РНК-транскриптів плазмід, які обумовлюють вірулентність бацил, від деградуювальної активності різних факторів.

Раніше проілюстровано, що інвертовані повтори утворюють хрестоподібні структури в негативно суперспіралізованих ДНК *in vivo* та *in vitro* [18–20]. Для детекції шпилькових структур *in vitro* розроблено біохімічні [21] та біофізичні методи. У той час, як молекулярно-біологічні методи, засновані на розрізанні нуклеазою (специфічною до одноланцюгової ДНК) петлі шпильки, дозволяють визначити послідовність та локалізувати розташування інвертованого повтора на геномі, сучасні методи нанобіотехнології, насамперед скануюча зондова мікроскопія, дають можливість безпосередньо візуалізувати шпилькову структуру [22].

Відомо, що найлабільнішими макромолекулами, присутніми у клітинах, є молекули РНК. Рівень мРНК регулюється і на стадії синтезу, і на стадії деградації. Стабільність мРНК визначається комбінацією *транс*- і *цис*-факторів, перші з яких містять екзо- та ендорибонуклеази, а другі можна згрупувати в два класи – стабілізатори та дестабілізатори. Елементи, що дестабілізують, забезпечують зв'язування нуклеаз та ініціацію процесів деградації. На відміну від них стабілізатори запобігають деградації мРНК, блокуючи дію різних нуклеаз. Один із можливих механізмів стабілізації мРНК пов'язаний з формуванням неканонічної (шпилькової) структури на 3'- або 5'-кінці мРНК. Так, наприклад, утворення зазначеної шпильки на 5'-кінці стабілізує мРНК *Escherichia coli* через запобігання взаємодії 5'-кінця мРНК з РНКазою E [23].

Окрім того, шпилькові структури часто виникають всередині внутрішніх термінаторів транскрипції (специфічних фрагментів ДНК-матриці, на яких зупиняється та надалі, як правило, дисоціює елонгаційний комплекс РНК-полімераза–ДНК-

матриця–РНК-транскрипт). І хоча у багатьох бактерій (до яких належить і збудник сибірської виразки) класичні термінатори транскрипції зустрічаються нечасто, можна припустити, що знайдені шпилькові структури формуються для регуляції на рівні транскрипції.

Таким чином, проведений у даній роботі аналіз послідовностей плазмід *pXO1* і *pXO2* *B. anthracis* дозволив створити фізичні карти плазмід з локалізованими досконалими та недосконалими інвертованими повторами, які потенційно здатні утворювати термодинамічно стабільні шпилькові структури. Довжина високостабільних шпильок варіює від 66 до 19 н., а енергія – від –30,6 до –10,3 ккал/моль.

Переважає більшість визначених шпилькових структур на фізичних картах плазмід *pXO1* і *pXO2* локалізована в області позитивних транс-регуляторів або в елементах з невизначеною функцією. Ми припускаємо, що шпилькові структури у геномі плазмід *pXO1* і *pXO2* локалізовані не випадково, вони можуть бути розташовані у ділянках промоторів і термінаторів транскрипції, а також біля «гарячих» точок рекомбінації подібно до довгих гомопуринових трактів, що мають потенціал до утворення триплексів [24].

Роботу підтримано грантами АМН 47/2002 та АМН 72/2007 від Академії медичних наук України.

O. Yu. Limanskaya, A. P. Limanskii

Distribution of hairpin-loop structures in plasmids of anthrax infectious agent

Summary

An important biological function of hairpin-loop structures is the defense of RNA transcripts from degradation by different factors as well as the transcription regulation due to their formation in transcription terminators. The patterns of thermodynamically stable perfect and imperfect inverted repeats were determined for pXO1 and pXO2 plasmids of pathogenic Bacillus anthracis strains. A sequence analysis of these plasmids has shown the plasmid pXO1 contains 176 inverted repeats, the energy of which varies from –30.6 kcal/mol to –10.0 kcal/mol, and the plasmid pXO2 of B. anthracis contains 57 inverted sequences with energy from –27.2 kcal/mol to –10.0 kcal/mol. Physical maps of the pXO1 and pXO2 plasmids with located hairpins are presented. These hairpin-loop structures are shown to be localized in the sites of regulatory genes or the elements encoding proteins of unknown function.

Keywords: Bacillus anthracis, hairpin-loop structure, inverted repeat, cruciform structure.

O. Yu. Limanskaya, A. P. Limanskii

Распределение шпильчных структур в плаزمидах возбудителя сибирской язвы

Резюме

Одной из важных биологических функций шпильчных структур является защита РНК-транскриптов от деградирующего действия разных факторов, а также регуляция транскрипции за счет их формирования в терминаторах транскрипции. Проведен поиск и определены распределения термодинамически стабильных совершенных и несовершенных инвертированных повторов в плазмидах pXO1 и pXO2 патогенных штаммов Bacillus anthracis. Анализ последовательностей плазмид pXO1 и pXO2 B. anthracis выявил, что первая содержит 176 инвертированных последовательностей с энергией от –30,6 до –10,0 ккал/моль, а вторая – 57 шпильк с энергией от –27,2 до –10,0 ккал/моль. Представлены физические карты плазмид pXO1 и pXO2 с локализованными шпильчными структурами. Показано, что последние на физических картах плазмид pXO1 и pXO2 локализованы в области регуляторных генов или в элементах с неопределенной функцией.

Ключевые слова: Bacillus anthracis, шпильчная структура, инвертированный повтор, крестообразная структура.

PERELIK LITERATURY

1. *Проблемы и перспективы молекулярной генетики.*—М.: Наука, 2004.—Т. 2.—334 с.
2. *Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2005.—**102**.—P. 15545–15550.
3. *Katayama S., Tomaru Y., Kasukawa T., Waki K., Nakanishi M., Nakamura M., Nishida H., Yap C. C., Suzuki M., Kawai J., Suzuki H., Carninci P., Hayashizaki Y., Wells C., Frith M., Ravasi T., Pang K. C., Hallinan J., Mattick J., Hume D. A., Lipovich L., Batalov S., Engstrom P. G., Mizuno Y., Faghihi M. A., Sandelin A., Chalk A. M., Mottagui-Tabar S., Liang Z., Lenhard B., Wahlestedt C.* Antisense transcription in the mammalian transcriptome // *Science.*—2005.—**309**.—P. 1564–1566.
4. *Chunsun R., Kyunghye L., Cheonkwon Y., Won K. S., Hee-Bok O.* Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR // *Microbiol. Immunol.*—2003.—**47**.—P. 693–699.
5. *Makino S. I., Cheun H. I., Watarai M., Uchida I., Takeshi K.* Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR // *Lett. Appl. Microbiol.*—2001.—**33**.—P. 237–240.
6. *Ellerbrok H., Nattermann H., Ozel M., Beutin L., Appel B., Pauli G.* Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR // *FEMS Microbiol. Lett.*—2002.—**214**.—P. 51–59.
7. *Deutscher M., Li Z.* Exoribonucleases and their multiple role in RNA metabolism // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—2001.—**66**.—P. 67–105.
8. *Grunberg-Manago M.* Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages // *Annu. Rev. Genet.*—1999.—**33**.—P. 193–227.

9. Лиманский А. П., Лиманская О. Ю., Волянский Ю. Л. Компьютерный анализ инвертированных повторов в геноме микобактерий туберкулеза // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.–2004.–№ 5.–С. 48–52.
10. Hacker J., Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes // Annu. Rev. Microbiol.–2000.–**54**.–P. 641–679.
11. Rychlik W., Spencer W., Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // Nucl. Acids Res.–1990.–**18**.–P. 6409–6417.
12. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов П. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneVee // Биополимеры и клетка.–1991.–**7**.–С. 10–14.
13. Lilley D. Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA molecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1980.–**77**.–P. 6468–6472.
14. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. The absence of cruciform structures from *pAO3* plasmid DNA *in vivo* // J. Biomol. Struct. and Dyn.–1984.–**2**.–P. 291–301.
15. Sinden R., Pettijohn D. Cruciform transitions in DNA // J. Biol. Chem.–1984.–**259**.–P. 6593–6600.
16. Kashlev M., Komissarova N. Transcription termination: primary intermediates and secondary adducts // J. Biol. Chem.–2002.–**277**.–P. 14501–14508.
17. Okinaka R. T., Cloud K., Hampton O., Hoffmaster A. R., Hill K. K., Keim P., Koehler T. M., Lamke G., Kumano S., Mahillon J., Manter D., Martinez Y., Ricke D., Svensson R., Jackson P. J. Sequence and organization of *pXO1*, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes // J. Bacteriol.–1999.–**181**.–P. 6509–6515.
18. Panyutin I., Lyamichev V., Lyubchenko Y. A sharp structural transition in *pAO3* plasmid DNA caused by increased superhelix density // FEBS Lett.–1982.–**148**.–P. 297–301.
19. Panyutin I., Klishko V., Lyamichev V. Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. and Dyn.–1984.–**1**.–P. 1311–1324.
20. Vologodskii A. Formation of unusual structures in the supercoiled DNA. Influence of transitions // Mol. Biol.–1988.–**22**.–P. 687–692.
21. Nasar F., Jankowski C., Nag D. Long palindromic sequences induce double-stranded breaks during meiosis in yeast // Mol. and Cell. Biol.–2000.–**20**.–P. 3449–3458.
22. Лиманський О. П., Лиманська О. Ю. Вивчення геномної ДНК мікроорганізмів методом атомно-силової мікроскопії // Цитологія і генетика.–2002.–**36**.–С. 30–36.
23. Unniraman S., Chatterji M., Nagaraja V. A hairpin near the 5' end stabilises the DNA gyrase mRNA in *Mycobacterium smegmatis* // Nucl. Acids Res.–2002.–**30**.–P. 5376–5381.
24. Katayama T., Inoue N., Torigoe H. Location of the triplex DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Stm1 protein // Nucl. Acids Res.–2007.–**35**.–P. 123–124.

УДК 577.2:573.6:616-0227
Надійшла до редакції 30.05.08