МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Петушков Иван Владимирович

Роль специфических контактов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК в формировании транскрипционных пауз

03.01.03 – Молекулярная биология Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук А.В. Кульбачинский

Москва – 2017

оглавление

1 ВВЕДЕНИЕ	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
2 OB3OP ЛИТЕРАТУРЫ 12 2.1 ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТРАНСКРИПЦИИ 12 2.2 СТРУКТУРА ХОЛОФЕРМЕНТА РНКП. 16 2.3 МЕХАНИЗМА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ. 19 2.3.1 Устройство промоторов главной о-субъединицы. 19 2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора. 20 2.3.3 И Зоследовательности собъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединици. 28 2.4 МЕХАНИЗМЫ УЛОНТАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ 11 2.4 / Сяязывание пуклеотидных субстратов и динациация пранскритции. 31 2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции 31 2.4.1 Саязывание пуклеотидных субстратов и диналика активного центра. 36 2.4.4 Механизы катализа включения НТФ в активном центре РНКП 36 2.4.4 Механизы катализа включения НТФ в активном центре РНКП 37 2.5 МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПАУЗ 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.3 Какими формирования транскритционных паузах. 42 2.5.4 Киници транскритционных паузах. 42	1 ВВЕДЕНИЕ	7
2.1 Общие представления о транскрипции 12 2.2 Структура холовермента РНКП 16 2.3 Механизмы инициации транскрипции 19 2.3.1 Структурные основы узнавания последовательности промотора 20 2.3.1 Последовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Лоледовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Лоледовательность событи промотора 20 2.3.5 Классификация субъединицы 27 2.3.5 Классификация субъединици 27 2.3.5 Классификация субъединици 27 2.3.5 Классификация субъединици 27 2.3.7 Крассификация субъединици 27 2.3.5 Классификация субъединици (Транскритции) 31 2.4.1 Структурные основы элонсации транскритции 31 2.4.2 Связывание пуклеотидных субстратов и динамика активного центра 33 2.4.3 Механизм транслокации PHKII 36 2.5.1 Обратная транскритционных пауза 42 2.5.1 Обрице представания и транскритционных пауза 42 2.5.1 Обицие представания и транскритционных пауза 42 2.5.1 Манациантрикации транскритционных пауза 42 2.5.1 Манациантрикавания пранскритционных пауза 42	2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
2.2 СТРУКТУРА ХОЛОФЕРМЕНТА РНКП. 16 2.3 МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ. 19 2.3.1 Устройство промоторов главной в-субъединицы. 19 2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора 20 2.3.3 Последовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Альтернативные в-субъединицы. 27 2.3.5 Классификтция субъединиц 7 ⁷⁰ -семейства. 28 2.4 МЕХАНИЗМЫ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ 31 2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции. 31 2.4.2 Связывание нухлеотидных субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП. 36 2.4.5 Обратная транскритционных пауза. 40 2.5.1 Общие представления отранскритционных пауза. 42 2.5.1 Общие предоставления пранскритционных пауза. 44 2.5.2 Механизм формирования транскритционных пауза. 44 2.5.3 Консенсусные паузы. 47 2.5.4 Ипициаторная пауза. 47 2.5.5 Шлизько-зависимые паузы. 47 2.5.6 Шлизько-зависикые паузы. 47 2.5.6 Шлизько-зависикые паузы. 55 3.1 Метепраставленные сотрудниками ЛМГМ. 59	2 1 Общие представления о транскрипции	12
2.3 МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ. 19 2.3.1 Устройство промоторов главной о-субъединицы. 19 2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора. 20 2.3.3 Последовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Альтернативные о-субъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединици 27 2.3.5 Классификация субъединици 27 2.4.4 МЕХАНИЗМЫ ЭЛОНГАЦИИ ГРАНСКРИПЦИИ 31 2.4.1 Структурные основы элонсации транскритции 31 2.4.2 Связывание пухлеотидных субстратов и динамика активного центра 33 2.4.3 Механизи катализа включения ПТФ в активном центре PIIKII 36 2.4.4 Механизи транскокации PIIKII 36 2.4.5 Обраниая транскокация 40 2.5 МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПАУЗ 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах 42 2.5.1 Общие предоставления о транскритционных паузах 42 2.5.4 Инициаторпая пауза 45 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Общие представления о терминации транскокацией 47 2.5.6 Общие представления о отерминации транскокацией 47 2.5.6 Какличизмфорацизмы с обратной транс	2.2 Структура холофермента РНКП	12
2.3.1 Устройство промоторов главной о-субъединицы. 19 2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора 20 2.3.3 Последовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Альтерналивные о-субъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединицы? 27 2.3.5 Классификация субъединицы? 27 2.3.6 Классификация субъединицы? 28 2.4 Механизмы Элонгации транскритции 31 2.4.1 Структурные основы элонсации транскритции. 31 2.4.2 Связывание нуклеотидных субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП. 36 2.4.4 Механизм транскокция. 40 2.5.1 Общие представления о транскритционных пауза. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных пауза. 44 2.5.1 Общие представления о транскритционных пауз. 44 2.5.2 Механизм формирования транскритционных пауз. 44 2.5.3 Консенсусные паузы. 45 2.5.4 Инициаторна поуза. 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы. 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы. 50 2.6 Общие представления о терминации транскокацией. 52	2.2 СП УКТУТА ДОЛОФИ МЕНТАТ ПИСТ	10
2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора 20 2.3.3 Последовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Альтернативные σ-субъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединицы. 27 2.3.6 Классификация субъединицы. 27 2.3.7 Классификация субъединици σ ³⁰ -семейства 28 2.4.4 Механизмы элонгации транскритции. 31 2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции. 31 2.4.2 Связывание пускеотильх субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП. 36 2.4.4 Механизм транслокации PIKII. 37 2.4.5 Обратная транскокация инискритционных пауза. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных пауза. 42 2.5.2 Механизм формирования транскритционных пауза. 42 2.5.3 Колсенсусные паузы. 50 2.5.4 Инициатория пауза. 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транскокацией 47 2.5.6 Илизько-зависимые паузы. 50 2.6 Общие пердставления о терминации транскокацией 51 2.6 Общие пердставления о терминации транскокацией 47 2.5.5 Плауы, сопровождаемые обратной транскокацией <td>2.3.1. Устройство промоторов главной а-субъединицы</td> <td>19</td>	2.3.1. Устройство промоторов главной а-субъединицы	19
2.3.3 Полгедовательность событий при инициации транскритции. 23 2.3.4 Альтернативные о-субъединицы. 27 2.3.5 Классификация субъединиць о ⁷⁰ -семейства. 28 2.4 Механизмы элонг лции транскритции 31 2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции. 31 2.4.2 Связывание пуклеотидных субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активеном центре РНКП. 36 2.4.4 Механизм катализа включения НТФ. 37 2.4.5 Обратная транскогация 40 2.5 Механизм катализа включения НТФ. 37 2.4.5 Обратная транскокация 40 2.5 10 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.2 Механизм формирования транскритционных паузах. 42 2.5.4 Итициаториая пауза 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транскокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3.1 Бактериалы и тетроды. 56 3.1 Бактериалы Белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4 Питарькые среды и антикотики 59 3.5 Ко	2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора	20
2.3.4 Альтернативные σ-субъединци 5 27 2.3.5 Классификация субъединци 5 ⁷⁰ -семейства 28 2.4 Механизмы элонгации транскритции 31 2.4.1 Структурные основы зольсации транскритции 31 2.4.2 Связывание нуклеотидных субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре PHKII 36 2.4.4 Механизм транслокация PHKII. 37 2.4.5 Обратная транслокация 400 2.5 Механизм формирования транскритционных паузах. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.2 Механизм формирования транскритционных паузах. 42 2.5.3 Консенсусные паузы. 45 2.5.4 Инициаторная пауза. 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шлилько-зависимые паузы. 50 2.6 Общие представления о терминации транскритции. 52 2.6 Заключение по овзору литературы. 55 3.1 Препараты велков, предоставленые сотрудниками ЛМГМ. 59 3.4.1 Питателыные среды и антибиотики. 59 3.6.1 Былстериальные среды и антибиотики. 59 3.6.1 Былстериальные плазмидной ДНК Е. сол. 61 <t< td=""><td>2.3.3 Последовательность событий при инииации транскрипиии</td><td> 23</td></t<>	2.3.3 Последовательность событий при инииации транскрипиии	23
2.3.5 Классификация субъединиц σ ⁷⁶ -семейства	2.3.4 Альтернативные σ-субъединицы	27
2.4 МЕХАНИЗМЫ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ 31 2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции 31 2.4.2 Связывание нуклеотидных субстратов и динамика активного центра. 33 2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП. 36 2.4.4 Механизм транслокации РНКП. 37 2.4.5 Обратная транслокация РТФ в активном центре РНКП. 36 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах. 42 2.5.3 Консенсусные паузы. 45 2.5.4 Инациаторная пауза. 47 2.5.5 Пизуы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы. 50 2.6 Общие представления о терминации транскокацией 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3.1 Бактериальные штаммы 56 3.1 Патательные средки и транскорищия бактерий 59 3.6 Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6 Кыделение геномой ДНК Е. соц. 61 3.8 Рестрикция ДНК 60 3.9 Выделение праломоторых фрагментов ДИК рактерий 59 3.6 Кыделе	2.3.5 Классификация субъединиц σ^{70} -семейства	28
2.4.1 Структурные основы элонгации транскритции	2.4 МЕХАНИЗМЫ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ	31
2.4.2 Связывалие нуклеотидных субстратов и динамика активного центра	2.4.1 Структурные основы элонгации транскрипции	31
2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП. 36 2.4.4 Механизм транслокации РНКП. 37 2.4.5 Обратная транслокация	2.4.2 Связывание нуклеотидных субстратов и динамика активного центра	33
2.4.4 Механизм транслокация 37 2.4.5 Обратная транслокация 40 2.5 Механизм формирования транскрипционных пауза 42 2.5.1 Общие представления о транскрипционных пауза 42 2.5.2 Механизм формирования транскрипционных пауза 42 2.5.3 Консенсусные паузы 45 2.5.4 Инициаторная пауза 47 2.5.5 Цлаузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.5 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскрипции. 52 2.6 Заключение по овзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56 3.1. Бактериальные паузы 56 3.1. Бактериальные паузы 56 3.1. Бактериальные по овзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56 3.1. Ползмиды 56 3.3. Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 61 3.9. Выделение приооторных фрагментов ДНК 61 3.9. Выделение промоторных фрагментов ДНК 62 <	2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП	36
2.4.5 Обратная пранслокация 40 2.5 Механизм формирования транскрипционных паузах 42 2.5.1 Общие представления о транскрипционных паузах 42 2.5.2 Механизм формирования транскрипционных паузах 42 2.5.3 Консенсусные паузы 45 2.5.4 Инициаторная пауза 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскрипции 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. 56 3.1 Бактериальные штамы 56 3.3 Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ. 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.6 Выделение плазмиды 61 3.8 Рестрикция ДНК 61 3.9. Выделение ДНК из агарозного геля 61 3.10.1 Получение плазмиды рІАб79_МХ гров с делецие кодонов 533-546 63 3.11.1. Получение плазмиды рГА67_MX гров с делецие кодонов 533-546 63 3.11.1. Получение плазмиды рЕТ28_адhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой е +11G	2.4.4 Механизм транслокации РНКП	37
2.5 МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПАУЗ 42 2.5.1 Общие представления о транскрипционных паузах. 42 2.5.2 Механизм формирования транскрипционных паузах. 42 2.5.3 Консенсусные паузы. 45 2.5.4 Ипициаторная пауза 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Овщие представления о терминации транскрипции. 52 3.6 Кактериалы и МЕТОДЫ	2.4.5 Обратная транслокация	40
2.5.1 Общие представления о транскритционных паузах	2.5 МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПАУЗ	42
2.5.2 Механизм формирования транскрипционных пауз	2.5.1 Общие представления о транскрипционных паузах	42
2.5.3 Консенсусные паузы 45 2.5.4 Инициаторная пауза 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Оыцие представления о терминации транскрипции. 52 2.6 Оыцие представления о терминации транскрипции. 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. 56 3.1. Бактериальные штаммы 56 3.2. Плазмиды 56 3.3. Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК 61 3.9. Рестрикция ДНК 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). 62 3.11.1. Получение празмиды рЕА?9_мото геля 61 3.11.2. Получение плазмидь с мутациями в сене гроВ в векторе рВАD. 64 3.11.3. Получение плазмидь pET28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в + 11G. 65 3.11.4. Получение плазмидь pET28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в + 11G. 65 3.11.4. Получение плазмидь с мутациями в сене гроВ в	2.5.2 Механизм формирования транскрипционных пауз	44
2.5.4 Инициаторная пауза 47 2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскрипции 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56 3.1. Бактериальные штаммы 56 3.2. Плазмиды 56 3.3. Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение промоторных фрагментов ДНК 61 3.9. Выделение празмидной ДНК 61 3.9. Выделение промоторных фрагментов ДНК 62 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.11.1. Получение плазмиды рІАб79_МХ гров с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой е +11G. 65 3.12. Электрофорез велков в денатурирующем геле 66 3.13. Определение концентрации белка. 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и б ³⁸ -субъединицы PHK-по	2.5.3 Консенсусные паузы	45
2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией 47 2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскрипции 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56 3.1. Бактериальные штаммы 56 3.2. Плазмиды 56 3.3. Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение гназмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК 61 3.9. Выделение геномной ДНК 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). 62 3.10.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рІА679_ПАХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.4. Получение плазмиды рІА679_ПАХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.4. Получение плазмиды рІА79_ПАХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рІА679_ПАХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.4. Получение плазмиды рІА579_ПАХ гроВ с делецией код	2.5.4 Инициаторная пауза	47
2.5.6 Шпилько-зависимые паузы 50 2.6 Общие представления о терминации транскрипции 52 2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56 3.1. Бактериальные штаммы 56 3.2. Плазмиды 56 3.3 Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК <i>Е. СОЛ</i> 61 3.8. Рестрикция ДНК 61 3.9. Выделение геномной ДНК <i>Е. СОЛ</i> 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение плазмиды рЕАб79_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.1. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F 65 3.11.2. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ28_adhEp1_htxCDABE и её варианта с заменой в +11G 65 3.12. Электрофорез белков в дена турирующем геле 66 3.13. Определение кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы PHK-полимеразы Е. COL 67	2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией	47
2.6 Общие представления о терминации транскрипции	2.5.6 Шпилько-зависимые паузы	50
2.6 Заключение по обзору литературы 55 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	2.6 Общие представления о терминации транскрипции	52
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	2.6 Заключение по обзору литературы	55
3.1. Бактериальные штаммы 56 3.2. Плазмиды 56 3.3. Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ. 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК 60 3.8. Рестрикция ДНК 61 3.9. Выделение геномной ДНК <i>E. coli</i> 61 3.9. Выделение дНК из агарозного геля 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК. 62 3.11.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.12. Электрофорез белков в денатурирующем геле. 66 3.13. Определение концентрации белка 65 3.14. Суперпродукция кор-фермента и о ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы <i>E. coli</i> 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента РНКП <i>E. coli</i> 67	3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	56
3.2. Плазмиды 56 3.3 Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ 59 3.4. Питательные среды и антибиотики 59 3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий 59 3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК <i>E. Coli</i> 61 3.8. Рестрикция ДНК 61 3.9. Выделение геномной ДНК <i>E. Coli</i> 61 3.9. Выделение дНК из агарозного геля 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК 62 3.11.1. Получение плазмиды pIA679_MX rpoB c делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмидь pIA679_MX rpoB c делецией кодонов 533-546 63 3.11.3. Получение плазмиды pET29_rpoS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды pET28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в е +11G 65 3.12. Электрофорез белков в денатурирующем геле. 66 3.13. Определение концентрации белка 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы PHK-полимеразы E. col1 66 67 3.14. Суперпродукция кор-фермента и с ³⁸ -субъединицы PHK-полимеразы E. col1 66 67	3.1. Бактериальные штаммы	56
3.3 ПРЕПАРАТЫ БЕЛКОВ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ СОТРУДНИКАМИ ЛМГМ	3.2. Плазмиды	56
3.4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И АНТИБИОТИКИ 59 3.5. КОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ 59 3.6. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК 60 3.7. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК Е. COLI 61 3.8. РЕСТРИКЦИЯ ДНК 61 3.9. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ 61 3.10. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) 62 3.10.1. ПОЛУЧЕНИЕ промоторных фрагментов ДНК. 62 3.11.1. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД 63 3.11.1. ПОЛУЧЕНИЕ плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546. 63 3.11.2. ПОЛУЧЕНИЕ плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в +11G. 65 3.12. Электрофорез белков в дена турирующем Геле. 66 3.13. Определение концентрации белка 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы Е. COLI 66 67 3.14. Суперпродукция кор-фермента и с ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы Е. COLI 66 67	3.3 ПРЕПАРАТЫ БЕЛКОВ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ СОТРУДНИКАМИ ЛМГМ	59
3.5. КОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ 59 3.6. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК 60 3.7. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК Е. COLI 61 3.8. РЕСТРИКЦИЯ ДНК 61 3.9. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ 61 3.10. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) 62 3.10.1. ПОЛУЧЕНИЕ промоторных фрагментов ДНК 62 3.11.1. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД 63 3.11.1. ПОЛУЧЕНИЕ плазмиды pLA679_MX rpoB c deлequeй кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды pLA679_MX rpoB c denequeй кодонов 533-546 63 3.11.3. Получение плазмиды pET29_rpoS_L117F 65 3.11.4. Получение плазмиды pET28_adhEp1_luxCDABE u её варианта с заменой в +11G 65 3.12. Электрофорез БЕЛКОВ В ДЕНАТУРИРУЮЩЕМ ГЕЛЕ 66 3.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы PHK-полимеразы E. coli 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы PHK-полимеразы E. coli 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента И та 63 64 3.15. ВЫДЕЛЕНИЕ КОР-ФЕРМЕНТА РНКП E. COLI 67	3.4. Питательные среды и антибиотики	59
3.6. Выделение плазмидной ДНК 60 3.7. Выделение геномной ДНК Е. СОП. 61 3.8. Рестрикция ДНК 61 3.9. Выделение ДНК из агарозного геля 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК. 62 3.11.1. Получение промоторных фрагментов ДНК. 63 3.11.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546. 63 3.11.2. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.12. Электрофорез Белков в денатурирующем геле. 66 3.13. Определение концентрации белка 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы Е. сош 67	3.5. КОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ	59
3.7. Выделение геномной ДНК Е. COLI	3.6. Выделение плазмидной ДНК	60
3.8. РЕСТРИКЦИЯ ДНК 61 3.9. Выделение ДНК из агарозного геля 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК. 62 3.11.1. Получение промоторных фрагментов ДНК. 63 3.11.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.3. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F. 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в +11G. 65 3.12. Электрофорез Белков в денатурирующем геле. 66 3.13. Определение концентрации белка. 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы Е. сосы 66 66 3.15. Вылеление кор-фермента РНКП Е. соы. 67	3.7. Выделение геномной ДНК <i>Е. соli</i>	61
3.9. Выделение ДНК из агарозного геля 61 3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 62 3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК 62 3.11.1. Получение промоторных фрагментов ДНК 63 3.11.1. Получение плазмиды рІА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.2. Получение плазмиды рЕА679_МХ гроВ с делецией кодонов 533-546 63 3.11.3. Получение плазмиды рЕТ29_гроS_L117F 65 3.11.4. Получение плазмиды рЕТ28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в 61 4.11G 65 3.12. Электрофорез белков в денатурирующем геле 66 3.13. Определение концентрации белка 66 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы Е. сосы 66 67 3.15. Выделение кор-фермента РНКП Е. соц. 67	3.8. Рестрикция ДНК	61
3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	3.9. Выделение ДНК из агарозного геля	61
3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК	3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	62
 3.11. Получение рекомбинантных плазмид	3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК	62
 3.11.1. Получение плазмиды pIA679_MX rpoB с делецией кодонов 533-546	3.11. Получение рекомбинантных плазмид	63
3.11.2. Получение плазмидо с мутациями в гене гроВ в векторе pBAD	3.11.1. Получение плазмиды pIA679_MX rpoB с делецией кодонов 533-546	63
 3.11.3. Получение плазмиды pET29_rpoS_L11/F	3.11.2. Получение плазмид с мутациями в гене rpoB в векторе pBAD	64
3.11.4. Получение плазмиоы pE128_adhEp1_luxCDABE и ее варианта с заменои в +11G	3.11.3. Получение плазмиды pET29_rpo8_L11/F	63
 - 110	3.11.4. Получение плазмиды pET28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заме	нои в 65
 3.12. Электрофорез велков в денатурирующем геле	± 110	U
 3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ³⁸-субъединицы РНК-полимеразы <i>E. coli</i> 66 3.15. Выделение кор-фермента РНКП <i>E. coli</i>	3.12. ΟΠΕΚΤΡΟΦΟΡΕΞ ΒΕЛΙΚΟΒ Β ΔΕΠΑΤΥΡΥΙΟЩΕΝΤΕΙΕ	00
3.15. Выделение кор-фермента РНКП <i>Е. Со</i> Ц	3.14. Суперпролукция кор-фермента и σ^{38} -субъелиницы РНК-полимерары F_{-C}	60 011 66
	3.15. Вылеление кор-фермента РНКП <i>Е. соц.</i>	67

3.16. Выделение б ³⁸ -субъединицы РНК-полимеразы <i>Е. соli</i>	69
3.17. Электрофорез РНК в денатурирующем геле	69
3.18. ТРАНСКРИПЦИЯ IN VITRO	
3.18.1. Получение транскрипционных матриц	
3.18.2. Тест на наличие транскрипционной активности	
2.18.3. Определение кинетики диссоциации промоторных комплексов в прис	утствии 71
2 18 4. Тости на отподатации сполости от отости.	
5.18.4. <i>Lecm no onpedenetulo ckopocmu элонгации</i>	
5.18.5. Определение продолжительности піs-пауз на матрицах с сигналом	nay3 noo 72
2 18 6 Owned and an address was a second big ways a submemulation of the	
3.18.7. Определение проболжительности то-пауз в синтетических эк	········· / J
5.16.7. Определение эффективности терминиции тринскринции на терм tR2 бактериофага l	иниторе 73
$3.18.8$ Анализ σ -зависимых пауз в синтетических ЭК	
3 18 9 Измерение аффинности σ-субъединии к ЭК с по эффективности обр	азования
nav3bl	75
$3.18.10$ Исследование σ^{38} -зависимых пауз на природных промоторах	
3.19. Измерение аффинности Σ-субъединиц к ЭК метолом залержки в геле	
3.20. Исследование параметров расплавленного участка комплекса в сос	стоянии
ПАУЗЫ МЕТОДОМ ПЕРМАНГАНАТНОГО ФУТПРИНТИНГА	
3.21. Эксперименты <i>IN VIVO</i>	
3.21.1 Определение выживаемости клеток, экспрессирующих β-субъед мутаниями в СRF-кармане)иницу с 77
мутациями в СПР-кармане 3.21.2 Определение влияния мутаций в районе CRE-кармана β-субъеди	 ницы на 77
чувствительность к антибиотику рифампицину	
$3.21.3$ Определение влияния замены +11G в сигнале σ^{-3} -зависимой паузы пре adhF P1 на эффектиеность экспрессии репортерного зена	омотора 77
αμημ Τ Τ πα σφφεκιπαθησεικό σκειρετεία μεποριπερήσεο τεπα	
F E 5 9 JIB I A I BI	
4.1 Роль контактов CRE-кармана с ДНК в транскрипции и формировании г	тауз 79
4.1.1 Исследование роли остатка гуанина в +2 положении промо	отора в
стабилизации промоторного комплекса	80
4.1.2 Исследование влияния замен в CRE-районе на скорость э. транскрипции	лонгации 84
4.1.3 Исследование роли CRE-кармана при формировании шпилько-зависил	мых пауз
4.1.4 Роль CRE-кармана в процессе терминации на терминаторе λtR2	
4.1.5 Влияние замен в CRE-кармане РНКП на рост бактериальных клеток	
4.2 Изучение пауз, вызванных σ ³⁸ -субъединицей	
4.2.1 Изучение пауз, вызванных σ^{38}_{29} -субъединицей в синтетических ЭК	
4.2.2 Изучение пауз, вызванных σ^{38} -субъединицей на промоторе adhE P1	
4.2.3 Исследование σ^{38} -зависимой паузы на промоторе adhE P1 л	методом
перманганатного футпринтинга	101
4.2.4 Изучение механизмов связывания $\sigma^{3\delta}$ -субъединицы с ЭК при форм	ировании
паузы на промоторе adhE P1	103
4.2.5 Исследование б ²⁰ -зависимой паузы на промоторе еспВ Р1	105
4.2.6 Влияние замены +11G в сигнале паузы на матрице с промотором ad экспрессию репортерного гена in vivo	hE P1 на 106
5 ОБСУЖДЕНИЕ	109
ВЫВОЛЫ	120
	101
ЭЛАГ ОДАРНОСТИ	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЦ – активный центр,

БСА – бычий сывороточный альбумин,

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,

ДТТ – дитиотреитол,

НМФ (NMP) – нуклеозидмонофосфат,

нт. – нуклеотидов,

п.н. – пар нуклеотидов,

ПААГ – полиакриламидный гель,

ПЭГ – полиэтиленгликоль,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

РНК – рибонуклеиновая кислота,

РНКП – РНК-полимераза,

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетраацетат,

ЭК (ЕС) – элонгационный комплекс,

ЭКП – элонгационный комплекс РНКП в состоянии паузы,

АМРсРР – аденозин-5'-[(а, β)-метилено]-трифосфат,

АТР (АТФ) – аденозинтрифосфат,

BH – bridge helix, спираль-мост, F-спираль

CC – coiled-coil мотив,

СМРсРР – цитидин-5'-[(а, β)-метилено]трифосфат,

CRE - core recognition element (элемент, узнаваемый кор-ферментом РНКП),

СТР (ЦТФ) – цитидинтрифосфат,

dNTP (дHT Φ) – дезоксинуклеотидтрифосфат,

DMSO (ДМСО) – диметилсульфоксид,

ECF – Extra Cytoplasmic Functions (группа σ-субъединиц дополнительных цитоплазматических функций),

GTP ($\Gamma T\Phi$) – гуанозинтрифосфат,

HTX – helix-turn-helix (мотив спираль-поворот-спираль),

IPTG (ИПТГ) - изопропил-β-тио-D-галактопиранозид,

*К*_d – константа диссоциации,

MOPS – морфолинопропансульфоновая кислота,

NET-seq – секвенирование нативных элонгационных транскриптов,

NTP (НТФ) – рибонуклеозидтрифосфат(ы),

PIPES – пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота),

PMSF – фенилметилсульфонилфторид,

Rif-рифампицин,

SDS (ДСН) – додецилсульфат натрия,

Stl-стрептолидигин,

TH – trigger helix, триггерная спираль, G-спираль,

TL – trigger loop, триггерная петля, G-петля,

ТЕМЕD – N, N, N', N'- тетраметилэтилендиамин,

UTP (УТΦ) – уридинтрифосфат,

β'NCD – неконсервативный домен β'-субъединицы.

1 ВВЕДЕНИЕ

Транскрипция является первым этапом экспрессии генов, который Актуальность. контролируется на всех стадиях. У живых организмов этот процесс протекает при помощи многосубъединичных ДНК-зависимых РНК-полимераз (РНКП), которые проявляют значительное сходство, как на уровне аминокислотных последовательностей, так и на уровне пространственной структуры и механизмов функционирования. В связи с этим, бактериальная РНКП является очень удобным объектом для установления фундаментальных механизмов транскрипции. Исследования в системах in vitro и in vivo показали, что транскрипция не является монотонным процессом синтеза РНК, а сопровождается остановками, которые происходят на некоторых последовательностях ДНК. Такие остановки называются транскрипционными паузами, а последовательности ДНК, которые их вызывают – сигналами пауз. Транскрипционные паузы играют существенную роль в регуляции транскрипции, трансляции и, возможно, репарации повреждений в ДНК. Несмотря на доказанную регуляторную функцию пауз, молекулярные механизмы узнавания их сигналов остаются малопонятными, во многом, из-за недостатка информации о структуре транскрипционного комплекса в состоянии паузы и особенностях контактов РНКП с нуклеиновыми кислотами в таком комплексе.

Степень разработанности темы. Недавние структурные исследования промоторного комплекса бактериальной РНКП показали, что кор-фермент РНКП способен образовывать специфические контакты с расплавленной областью ДНК, хотя ранее считалось, что такие контакты осуществляет только σ-субъединица. Узнавание нуклеотидной последовательности в районе стартовой точки транскрипции происходит за счёт взаимодействий так называемого CRE-района (от английского core recognition element) β-субъединицы с нематричной цепью ДНК. Наиболее интересным оказалось взаимодействие гуанина в +2 положении нематричной цепи (+2G), который выпетливается из цепи ДНК и размещается в CRE-кармане, образуя специфические контакты с РНКП (Zhang et al., 2012). Роль таких взаимодействий остаётся непонятной, т.к. в последовательностях промоторов не обнаруживается явного предпочтения к гуанину в +2 положении (Mitchell et al., 2003). Это позволяет предположить, что данные взаимодействия нужны на других стадиях транскрипции, в частности, для узнавания сигналов пауз во время элонгации. В то же время, было обнаружено, что мутации в CRE-кармане, наоборот, усиливают транскрипционные паузы (Vvedenskaya et al., 2014). Кроме того, некоторые мутации в CRE-кармане делают РНКП устойчивой к антибиотику рифампицину и, как было обнаружено совсем недавно, могут приводить к устойчивости бактерий к антибиотикам разных групп, действующих на другие клеточные мишени, за счёт усиления

экспрессии транспортёра, который выкачивает молекулы лекарств из бактериальной клетки (Pietsch et al., 2017). Это является дополнительным свидетельством того, что данный район играет важную роль в регуляции транскрипции *in vivo*.

Использование различных вариантов σ -субъединицы, узнающих разные классы промоторов, является одним из базовых механизмов регуляции транскрипции у бактерий. У *Escherichia coli* помимо главной σ^{70} -субъединицы, есть ещё 6 альтернативных σ -субъединиц, 5 из которых родственны σ^{70} -субъединице (Gruber and Gross, 2003). Было установлено, что σ^{70} субъединица может оставаться связанной с элонгационным комплексом (ЭК) даже после ухода РНКП с промотора, а в некоторых условиях повторно присоединяться к ЭК (Goldman et al., 2015; Marr et al., 2001; Ring et al., 1996). ЭК, связавший σ^{70} -субъединицу, способен узнавать последовательности в ДНК, которые напоминают промотор, благодаря чему могут происходить транскрипционные паузы, потенциально играющие регуляторную роль в экспрессии генов. Способны ли альтернативные σ -субъединицы вызывать транскрипционные паузы, неизвестно. Изучение механизмов узнавания сигналов пауз за счёт контактов кор-фермента и альтернативных σ -субъединиц с ДНК, а также выяснение регуляторной роли таких пауз, является важной задачей дальнейших исследований.

Цель и задачи исследования. Цель работы: изучить роль контактов CRE-кармана PHKполимеразы *Escherichia coli* с нематричной цепью ДНК в формировании пауз транскрипции и выяснить, способны ли альтернативные *σ*-субъединицы *E. coli* вызывать транскрипционные паузы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить влияние мутаций в CRE-кармане РНКП *E. coli* на инициацию, элонгацию и терминацию транскрипции в системе *in vitro*.
- 2) Выяснить, как мутации аминокислотных остатков в CRE-кармане влияют на узнавание сигналов транскрипционных пауз разных классов.
- Установить, способна ли альтернативная σ³⁸-субъединица вызывать паузы транскрипции в промотор-подобных участках матрицы.
- Изучить механизм взаимодействия σ³⁸-субъединицы с элонгационным комплексом РНКП *E. coli*.

Научная новизна. В работе биохимическими методами показано связывание гуанина в +2 положении промоторного комплекса с CRE-карманом РНКП. Установлено, что остатки CRE-района играют важную роль на стадии элонгации и терминации транскрипции и вовлечены в узнавание сигналов пауз транскрипции определенного класса. Мутации в этом районе влияют на жизнеспособность клеток и их устойчивость к антибиотику рифампицину. Открыт и изучен

новый вид транскрипционных пауз, вызванных альтернативной σ^{38} -субъединицей *E. coli* и предложен возможный механизм регуляции экспрессии генов при её участии.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе установлены механизмы узнавания сигналов транскрипционных пауз за счёт специфических взаимодействий РНКП *E. coli* с нематричной цепью ДНК, что углубляет понимание фундаментальных основ работы одной из самых консервативных молекулярных машин. Аналогичные регуляторные механизмы могут функционировать как в случае РНКП других бактерий, так и РНКП эукариот. Так как РНКП абсолютно необходима для экспрессии генов, этот фермент является очень перспективной мишенью для разработки новых лекарственных ингибиторов транскрипции. В работе выявлены ранее не охарактеризованные мутации в РНКП, которые придают устойчивость бактериям к антибиотику рифампицину, широко применяемому в клинической практике. Изученные функционально-важные районы фермента могут служить мишенью для получения новых ингибиторов РНКП и антибиотиков.

Методология и методы исследования. Для получения РНКП, содержащих мутации в CREкармане, были созданы экспрессионные вектора, содержащие мутации, которые были использованы для гиперэкспрессии РНКП *E. coli* в штамме супер-продуценте, с их последующей хроматографической очисткой. Влияние мутаций на все стадии транскрипции было исследовано методами транскрипции *in vitro*. Во второй части работы был использован метод сборки синтетических элонгационных комплексов, содержащих потенциальные сигналы паузы для альтернативной σ^{38} -субъединицы. Также методом ПЦР были получены матрицы, содержащие промоторы альтернативной σ^{38} -субъединицы и их мутантные варианты, которые были протестированы на наличие σ -зависимых пауз в системе *in vitro*. Структура комплексов была исследована методом перманганатного футпринтинга. Для проверки влияния мутаций в кор-ферменте и σ -субъединице на рост клеток и экспрессию генов были использованы микробиологические и генетические подходы.

Положения, выносимые на защиту:

- мутации в CRE-районе РНКП влияют на все стадии транскрипции, за счет нарушения контактов РНКП с нематричной цепью ДНК, и изменяют чувствительность РНКП к рифампицину;

- связывание остатка гуанина нематричной цепи промотора в CRE-кармане РНКП стабилизирует промоторный комплекс;

- связывание остатка гуанина нематричной цепи ДНК в CRE-кармане способствует формированию шпилько-зависимых пауз транскрипции, причём этот эффект зависит от вторичной структуры транскрипта;

- мутации в CRE-кармане влияют на эффективность терминации транскрипции, возможно, изменяя продолжительность терминационной паузы;

- σ³⁸-субъединица способна вызывать паузы транскрипции в элонгационных комплексах, содержащих -10-подобный элемент, в системе *in vitro*; при формировании паузы ЭК приобретает смещённую конформацию и чувствителен к действию Gre-факторов;

- при инициации на природных промоторах σ³⁸-субъединица способна оставаться связанной с элонгационным комплексом и вызывать транскрипционные паузы *in cis*.

Личный вклад соискателя. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач, планировании экспериментов и обработке данных. Все эксперименты, представленные в работе, выполнены лично соискателем. Диссертация написана самостоятельно.

Степень достоверности результаты Результаты были получены на современном научном оборудовании, изготовленном ведущими мировыми производителями. В работе использовали классические, хорошо зарекомендовавшие себя методы, а также новые экспериментальные подходы, получившие хорошие отзывы на конференциях и при рецензировании статей. Все эксперименты были повторены несколько раз и хорошо воспроизводимы, результаты статистически обработаны в соответствии с существующими критериями.

Апробация результаты Результаты исследования опубликованы в трёх статьях в международных журналах, из них 2 в Nucleic Acids Research и 1 в RNA biology. Результаты были представлены на международных и всероссийских конференциях:

-42-й Конгресс FEBS Израиль, Иерусалим, 2017;

-29thAnnual UK Polymerase Workshop, Великобритания, Ньюкасл, 2017;

-41-й Конгресс FEBS (заочно), 2016;

-"Химическая биология-2016", Россия, Новосибирск, 2016;

-V съезд биохимиков России, Сочи, 2016;

-Всероссийская конференция с международным участием "50 лет ВОГиС: успехи и перспективы", 2016;

-VII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике "Геномика и биология живых систем" Россия, Звенигород, 2016;

-20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных "Биология Наука XXI века" Россия, Пущино, 2016;

-XXVIII Зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Россия, Москва, 2016;

-19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных "Биология Наука XXI века" Россия, Пущино, 2015;

-VII Российский симпозиум "Белки и пептиды" Россия, Новосибирск, 2015;

-18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных "Биология Наука XXI века" Россия, Пущино, 2014;

Устные доклады на конференциях "Биология Наука XXI века" были дважды признаны лучшими в секции "Молекулярная биология" в 2014 и в 2015 году, а постерное сообщение на симпозиуме "Белки и пептиды" в 2015 году было удостоено дипломом III степени.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: список используемых сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Работа изложена на 142 страницах, содержит 40 рисунков и 4 таблицы.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общие представления о транскрипции

Первым этапом экспрессии генов является транскрипция, которая осуществляется у всех клеточных организмов многосубъединичными РНК-полимеразами. Такие РНКП проявляют значительное структурное сходство (рисунок 2.1), что позволяет сделать предположение о происхождении всех клеточных РНКП от одного общего предка (Werner, 2012). Типичная бактериальная РНКП устроена проще всего и состоит из пяти субъединиц $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (общая молекулярная масса около 400 кДа). Эти субъединицы образуют так называемый кор-фермент РНКП, который можно рассматривать как эволюционный прототип всех клеточных РНКП (Borukhov and Nudler, 2008; Lane and Darst, 2010b). Для полноценной транскрипции в бактериальной клетке помимо кор-фермента необходима ещё и σ -субъединица, которая служит для узнавания и плавления ДНК в области промотора, а также выполняет некоторые другие функции (Feklistov et al., 2014).

Следует отметить, что у эубактерий обнаружены некоторые вариации устройства РНКП. Так, у бактерий родов Wolinella, Wolbachia и Helicobacter β и β'-субъединицы соединены в один гигантский полипептид (Lane and Darst, 2010a; Zakharova et al., 1999). У бактерий рода Francisella вместо гомодимера α-субъединиц в состав кор-фермента входит гетеродимер, который состоит из двух разных α1 и α2-субъединиц (Mukhamedyarov et al., 2011). Помимо изменений в последовательностях, в эволюции некоторых организмов происходила утеря, а также приобретение новых субъединиц РНКП. Так, хлоропласты большинства растений содержат уменьшенный вариант бактериального кор-фермента α₂ββ' (ω субъединица сохранилась только в хлоропластах отдела красные водоросли Rhodophyta), но в то же время могут приобретать до 30 дополнительных субъединиц РНКП (Liere et al., 2011; Steiner et al., 2011). В митохондриях большинства эукариот найдены односубъединичные РНКП, которые родственны РНКП бактериофагов. Но у некоторых простейших в митохондриях с большим геномом обнаружены ортологи бактериальных а, β и β'-субъединиц (Barbrook et al., 2010). Также известны гигантские бактериофаги, такие как phiKZ и родственный ему AR9, которые имеют неканонические многосубъединичные РНКП, большие субъединицы которых проявляют дальнее родство к клеточным полимеразами (Lavysh et al., 2017; Yakunina et al., 2015). Принято считать, что у бактерий есть только одна РНКП. Однако, последние исследования показывают, что это не является универсальным правилом. Выявлен организм Nonomuraea gerenzanensis, который имеет два варианта β-субъединицы. Было показано, что смена β-субъединицы приводит к значительным изменениям в метаболизме. Эти β-субъединицы сильно похожи по аминокислотной последовательности, что позволяет предположить, что их дивергентное расхождение является недавним эволюционным событием (D'Argenio et al., 2016).



Рисунок 2.1. Структура многосубъединичных РНКП из трёх доменов живого мира: бактерии (Bacteria), археи (Archaea), эукариоты (Eucarya) (Werner 2012 с изменениями). Структура бактериальной РНКП в разных ракурсах (А и Г). Структура РНКП архей в разных ракурсах (Б и Д). Структура РНКП II эукариот в разных ракурсах (В и Е). Универсальные и консервативные домены показаны синим цветом, а субъединицы, которые присущи археям и эукариотам, показаны фиолетовым цветом. (Ж) Универсальное филогенетическое дерево живых организмов. Синим цветом показано, что общий предок всего живого имел древний вариант кор-фермента, который напоминал бактериальный. Фиолетовым цветом показано, что появление новых субъединиц, присущих современным археям и эукариотам, произошло у общего предка до разделения на домены Archaea и Eucarya.

У эукариот ядерные РНКП представлены как минимум трёмя классами: РНКП І транскрибирует гены рибосомных РНК, РНКП II отвечает за синтез мРНК и некоторых некодирующих РНК, РНКП III синтезирует тРНК, 58 РНК и другие некодирующие РНК (Martinez-Rucobo and Cramer, 2013). В настоящий момент имеется много структур эукариотических РНКП, в основном низших эукариот: Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, хотя недавно была расшифрована структура РНКП II быка Bos taurus (Bernecky et al., 2016; Ehara et al., 2017). Наиболее хорошо изученной является РНКП II из дрожжей S. cerevisiae, которая стала классическим эталоном РНКП эукариот. РНКП каждого класса содержит 12 и более субъединиц; в основе кора лежат субъединицы-ортологи бактериального фермента. Большие субъединицы дрожжевой РНКП II Rpb1 и Rpb2 гомологичны β'- и β-субъединицам, соответственно, а малые Rpb3 и Rpb11 являются дивергентными ортологами α-субъединицы, в то время как Rpb6 является ортологом ω-субъединицы. Остальные 7 субъединиц (Rpb4, Rpb5, Rpb7, Rpb8, Rpb9, Rpb10, Rpb12) локализованы на периферии молекулы фермента (Werner, 2012). У растений также найдены РНКП IV и V, которые родственны РНКП II, т.к. состоят из идентичных или гомологичных субъединиц. Функцией этих полимераз является синтез транскриптов, которые вовлечены в подавление экспрессии генов (Ream et al., 2009, Haag et al., 2011). Интересен также факт, что гены многосубъединичных РНКП найдены в геномах крупных мимивирусов из порядка Megavirales, которые кодируют РНКП, родственную ядерной РНКП II. Эта РНКП имеет консервативный кор, по составу субъединиц напоминающий бактериальный. Также РНКП, напоминающей ядерную РНКП I, была найдена в геноме поксвирусов (Fischer et al., 2010; Lane and Darst, 2010a).

В случае архей наблюдается общая тенденция, что, несмотря на то, что у них нет ядра, их аппарат экспрессии генов скорее напоминает эукариотический, чем бактериальный. У архей имеется только один тип РНКП, напоминающий эукариотическую РНКП (Wojtas et al., 2011). Сходство пространственных структур РНКП представителей разных царств живого показано на рисунке 2.1 А. На основании структур РНКП бактерий, архей и эукариот можно сделать вывод, что в ходе эволюции сохранялась общая архитектура центрального района молекулы, а усложнение организации фермента происходило путём добавления новых субъединиц на периферию.

Транскрипция состоит из трёх последовательных стадий: инициации, элонгации и терминации. В ходе инициации происходит узнавание специфической последовательности ДНК, которая называется промотором. Этот процесс сопровождается плавлением дуплекса ДНК в области точки старта транскрипции. Сам по себе кор-фермент не способен специфически узнавать и плавить ДНК-дуплекс во время инициации транскрипции. У бактерий эта проблема решается наличием дополнительной осубъединицы, которая может иметь разные

размеры (примерно в диапазоне от 19 до 70 кДа). Эта субъединица связывается с корферментом и образует холофермент $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ (Decker and Hinton, 2013; Murakami and Darst, 2003). У всех известных бактерий большинство генов домашнего хозяйства транскрибируются при участии холофермента РНКП, который содержит главную σ-субъединицу, которая обычно обозначается σ^{A} . У *E. coli* главную σ -субъединицу принято обозначать σ^{70} (по величине молекулярной массы). Число σ-субъединиц у бактерий может варьировать от 1 у Mycoplasma genitalium до 109 у Sorangium cellulosum (Gruber and Gross, 2003; Han et al., 2013). У бактерий, которые имеют более одной (главной) σ-субъединицы, остальные принято называть альтернативными. Связывание таких о-субъединиц приводит к образованию холоферментов, которые могут узнавать промоторы, отличающиеся от промоторов главной σ-субъединицы (Gruber and Gross, 2003). У архей и эукариот нет σ-субъединицы и процесс инициации происходит гораздо сложнее при участии базальных факторов транскрипции. Тот факт, что у этих организмов иной механизм инициации, чем у бактерий, позволяет предположить несколько сценариев эволюции: 1) РНКП общего предка живых организмов не использовала ни один из современных вариантов; 2) инициация происходила независимо от транскрипционных факторов, как это наблюдается у односубъединичных РНКП бактериофагов; 3) древний(-ие) фактор(-ы) был(-и) утерян(-ы) в ходе эволюции (Werner, 2012). В то же время, некоторые исследователи высказывают предположение, что σ-субъединица и фактор инициации TFIIB РНКП II эукариот являются древними ортологами (Iyer and Aravind, 2012).

Вторым этапом транскрипции является элонгация. Этот этап очень похож у всех клеточных полимераз. В ходе элонгации происходит включение НТФ в растущую цепь РНК в направлении от 5'- к 3'-концу с использованием одной из цепей ДНК в качестве матрицы, такую цепь называют матричной цепью ДНК, а комплементарную ей цепь – нематричной. Активный центр очень похож у всех многосубъединичных РНКП как по аминокислотной последовательности, так и по структуре и механизму катализа, который протекает при участии двух ионов Me^{2+} (обычно Mg^{2+}). В ходе элонгации формируется расплавленный участок ДНК размером 11-12 нт, который называется транскрипционным пузырём (Landick, 2005; Svetlov and Nudler, 2013). Элонгация периодически прерывается так называемыми транскрипционными паузами, которые имеют важное регуляторное значение (Landick, 2006). Заключительная стадия транскрипции называется терминацией. В ходе этого этапа происходит высвобождение РНК-транскрипции называется терминацией. В ходе этого этапа происходит высвобождение РНК-транскрипта, а также диссоциация РНКП от матрицы ДНК. Терминация может протекать как за счёт возможностей самого ЭК и связанных с ним нуклеиновых кислот, так и с привлечением белковых факторов (Ray-Soni et al., 2016). Более подробные данные о механизмах и регуляции транскрипции у бактерий приведены ниже.

2.2 Структура холофермента РНКП

На сегодняшний момент подавляющее большинство биохимических данных о бактериальной транскрипции получено на РНКП из *E. coli*, в то время как самые высококачественные структуры разрешены для РНКП из эволюционно далёких от неё бактерий *Thermus aquaticus* и *Thermus thermophilus* (Murakami et al., 2002b; Vassylyev et al., 2002). В представленном обзоре большинство данных будет именно о структуре РНКП из бактерий рода *Thermus*. Те структуры, которые опубликованы для РНКП *E. coli*, подтверждают общий принцип устройства данного фермента, хотя указывают на некоторые видоспецифические различия (Murakami, 2013).

При анализе структуры холофермента РНКП удалось расшифровать как кор-фермент, так и практически всю σ-субъединицу (Murakami et al., 2002b; Vassylyev et al., 2002). Молекула РНКП по своим внешним очертаниям напоминает клешню краба, одна половина которой образована преимущественно β-субъединицей, другая β'-субъединицей (рисунок 2.2 A).



Рисунок 2.2. Структура холофермента РНКП *Т. thermophilus* (Vassylyev et al., 2002). (A) Общий вид холофермента. σ -субъединица изображена желтым цветом. Показано расположение "coiled-coil" элемента в домене clamp β' -субъединицы (CC1), flap-домена β -субъединицы и района 3.2 σ -субъединицы. Два иона Mg²⁺ в активном центре изображены красными сферами. (Б) Структура σ -субъединицы в составе холофермента РНКП (ориентация субъединицы соответствует левой части рисунка). Сверху показана схема расположения консервативных районов σ -субъединицы и их цветовые обозначения. На структуре σ -субъединицы указано расположение района 3.2 и предполагаемое положение района 1.1.

Между ними находится полость, которая идёт практически по всей длине молекулы и называется главным каналом. В глубине главного канала расположен активный центр. Две самые большие β (показана зелёным цветом) и β '-субъединицы (показана тёмно-розовым) образуют друг с другом множество контактов, большая часть из которых находится в области связывания иона Mg²⁺, т.е. в активном центре. В состав молекулы входит димер α -субъединиц,

который расположен с противоположной стороны относительно входа в главный канал. Эти αсубъединицы взаимодействуют с β и β'-субъединицами при помощи своих N-концевых доменов. Та α-субъединица, которая образует контакты преимущественно с β-субъединицей обозначается αI (показана голубым цветом), а которая контактирует преимущественно с β'субъединицей - αII (тёмно-синий). Самая маленькая ω-субъединица (нарисована серым цветом) взаимодействует только с С-концевым доменом β'-субъединицы.

Спереди от активного центра расположен район fork (вилка), который принимает участие в расплетении дуплекса ДНК во время элонгации (на структуре не показан, см. рисунок 2.9). Также в формировании верхней части главного канала принимает участие домен β'-clamp (зажим). Его подвижность важна для продвижения полимеразы в ходе транскрипции (Weixlbaumer et al., 2013). Нижнюю часть главного канала образуют домены β-субъединицы, которые обозначают β1 и β2. Главный канал не является единственной полостью, которая ведёт в активный центр фермента. Сбоку имеется более узкий туннель, который называется вторичным каналом, его ширина в самом узком месте составляет примерно 12 Å. Через вторичный канал в активный центр поступают субстраты (Landick, 2005; Nudler, 2009), также область вторичного канала является одним из ключевых сайтов взаимодействия транскрипционных факторов с РНКП, которые используют район β'СС2 (coiled-coil2) в качестве площадки для связывания (Martinez-Rucobo and Cramer, 2013). На границе главного и вторичного каналов проходит α-спираль, которую обозначают "мостовой" спиралью (bridge helix, BH). Рядом с BH расположен элемент, который может принимать множество альтернативных конформаций, и его принято называть триггерной петлёй (trigger loop, TL). Оба этих элемента входят в состав в'-субъединицы. На описываемой выше структуре не удаётся разрешить структуру TL, однако, эта петля играет важную функцию при катализе (разделы 2.4.2 и 2.4.4) (Vassylyev et al., 2007b). На поверхности кор-фермента со стороны β'-субъединицы расположена практически вся σ-субъединица. Присоединение данной субъединицы приводит к значительной структурной перестройке в кор-ферменте РНКП, по сравнению со структурой свободного кор-фермента. В первую очередь, такие перестройки затрагивают область главного канала, что приводит к сближению β- и β'-субъединиц друг к другу; диаметр главного канала становится меньше диаметра ДНК-дуплекса, и для связывания промотора необходимо его открытие (Murakami et al., 2002b; Vassylyev et al., 2002). Также наблюдается изменение положений концевой спирали домена flap β-субъединицы и coiled-colil1 мотива β'-субъединицы $(\beta$ 'CC1), что способствует связыванию с ними σ -субъединицы (Vassylvev et al., 2002; Zuo and Steitz, 2015). Анализ первичной структуры и пространственной организации σ-субъединицы позволил выделить 4 домена, которые, в свою очередь, делятся на несколько районов (рисунок 2.2 Б). N-концевой домен σ-субъединицы, который включает консервативный регион σ 1.1, обогащён отрицательно заряженными аминокислотными остатками. Принято считать, что он служит для подавления неспецифического связывания свободной σ -субъединицы и холофермента с ДНК (Camarero et al., 2002; Dombroski et al., 1993; Young et al., 2002). Также есть данные о том, что данный регион может принимать участие в открытии главного канала при узнавании промотора (Mekler et al., 2002). Далее по ходу полипептидной цепи идёт домен σ 2, который включает районы с σ 1.2 по σ 2.5 (в некоторых работах район σ 2.5 обозначают σ 3.0), и организован преимущественно из α -спиралей. Районы σ 2.1 и σ 2.2 образуют множество контактов с β 'CC1 мотивом и N-концевым районом β '-субъединицы, что важно для формирования стабильного промоторного комплекса (Ko et al., 1998; Vassylyev et al., 2002).

Районы 2.3-3.0 вовлечены в узнавание -10 и ТС-элементов промотора (раздел 2.3.1). Район 3.2, который соединяет районы 2 и 4, проникает вглубь фермента в область активного центра и напрямую взаимодействует с матричной цепью ДНК в промоторном комплексе, что важно для её правильного позиционирования в активном центре (Basu et al., 2014; Pupov et al., 2014). С-концевой домен включает консервативные регионы 4.1 и 4.2 и отвечает за специфическое узнавание -35 промоторного элемента (Siegele et al., 1989; Zuo and Steitz, 2015). Этот домен расположен на поверхности кора вблизи от канала выхода РНК и взаимодействует с β-субъединицы. концевой спиралью домена flap Таким образом, σ-субъединица взаимодействует с кор-ферментом в нескольких местах и эти контакты распределены практически по всей её поверхности (общая площадь контактов составляет около 8230 Å² и является одной из самых больших среди известных белок-белковых комплексов). Столь значительное число контактов приводит к высокой аффинности связывания σ-субъединицы и кор-фермента ($K_d \sim 0.3$ нМ) (Maeda et al., 2000; Murakami et al., 2002а).

2.3 Механизмы инициации транскрипции

2.3.1 Устройство промоторов главной о-субъединицы

Анализ множества известных промоторов позволил выявить некоторые наиболее значительные элементы в их последовательностях (рисунок 2.3).



λP_R AAATATCTAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGC--ATGTACTAAGG T7A1 TAAAATTTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAGGATACTTACAGCC-ATCGAGAGGGA rmB P1 AAAATTATTTTAAATTTCCTCTTGTCA-GGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCCACCGACAGGGA

Рисунок 2.3. Взаимодействия между промоторными элементами и РНКП (Ruff et al., 2015). Положение, соответствующее точке начала транскрипции, обозначается +1 (показано зелёным цветом). Нуклеотиды, которые идут до точки старта, обозначаются знаком «-», после знаком «+». Дальше всего от точки старта находится UP-элемент промотора, который содержит ATбогатую последовательность (W обозначает A или T) и узнаётся α -субъединицами (показаны голубым цветом). Рядом с ним расположен -35 элемент, который узнаётся районом σ 4.2. Затем идёт спейсер. На расстоянии примерно 10 нуклеотидов левее точки старта находится -10 элемент, который может быть дополнен TG-элементом, они узнаются при участии районов σ 2.3-2.4 и σ 3.0. Далее идёт последовательность дискриминатора, который узнаётся районом σ 1.2.

Наиболее дальним от стартовой точки является UP-элемент (от английского upstream), который находится на среднем расстоянии от -60 до -40 нуклеотидов от точки старта. Этот элемент представляет собой AT-богатую последовательность, которая узнаётся C-концевым доменом α-субъединицы. UP-элемент содержит два субсайта – проксимальный и дистальный (для каждой α-субъединицы), причём дистальный элемент является более важным (Gourse et al., 2000; Ross et al., 1993). Поскольку последовательность UP-элемента богата AT-парами, это даёт основание предполагать, что основной функцией этого элемента является формирование изгиба ДНК при образовании промоторного комплекса (Gaal et al., 1994; Gourse et al., 2000).

Ближе к стартовой точке находится -35 элемент, который имеет консенсусную последовательность ТТGACA. Наиболее консервативными являются нуклеотиды -35T, -34T, -33G (Lisser and Margalit, 1993). Ключевым промоторным элементом является -10 элемент, который имеет консенсусную последовательность ТАТААТ. Наиболее консервативными являются нуклеотиды -11А и -7Т (Feklistov and Darst, 2011; Roberts and Roberts, 1996). Принято считать, что между -35 и -10 элементами нет консервативных последовательностей. Есть отдельное сообщение, что существует некий Z-элемент, который находится на расстоянии от -24 до -18 относительно точки старта, и его последовательность влияет на количество абортивных продуктов на синтетических промоторах (Yuzenkova et al., 2011). Однако, пока нет подтверждений существования этого элемента в природных промоторах. Так или иначе, важным является размер спейсера между -35 и -10 элементами. Наиболее типичным является расстояние между элементами в 17 нуклеотидов (Hawley and McClure, 1983). В некоторых промоторах имеется так называемый удлинённый -10 элемент (TG-элемент), который расположен на 1 нуклеотид левее -10 элемента, и узнаётся районом σ3.0. Этот мотив обнаружен примерно у 20% идентифицированных промоторов, причём он наиболее важен для функционирования промоторов с далёким от консенсуса -35 элементом или длинным спейсером между -10 и -35 элементами (Mitchell et al., 2003). Также на активность промоторов влияет ещё один элемент – дискриминатор, который располагается между -10 элементом и точкой старта (Feklistov et al., 2006; Haugen et al., 2006). Размер дискриминатора у большинства промоторов составляет 6-8 пар нуклеотидов. Дискриминатор узнаётся районом $\sigma 1.2$ (Zhang et al, 2012).

2.3.2 Структурные основы узнавания последовательности промотора

На сегодняшний день существует несколько взаимодополняющих работ, в которых разрешена пространственная структура промоторных комплексов РНКП *T. thermophilus* и *E. coli* с главной σ -субъединицей, а также промоторного комплекса *E. coli*, который содержит альтернативную σ^{38} -субъединицу (Basu et al., 2014; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2012; Zuo and Steitz, 2015). Данные исследования значительно дополняют имеющиеся генетические и биохимические данные о процессе инициации. В большинстве работ в качестве модельной системы используют конструкции из частично некомплементарных синтетических олигонуклеотидов, которые имитируют транскрипционный пузырь и ДНК дуплекс по ходу транскрипции (Basu et al., 2014; Zhang et al., 2012). В двух последних работах используют конструкции, которые воссоздают полноценный транскрипционный пузырь и включают -35 элемент (Basu et al., 2014; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2012; Zuo and Steitz, 2015).

На структурах видно, что σ-субъединица узнаёт промотор в расплетённой области благодаря взаимодействиям районов σ2 и σ1.2 с нематричной цепью ДНК в области

расплавленного дуплекса за счёт образования специфических контактов с нуклеотидами с -12 по -4 положение (рисунок 2.4).



Рисунок 2.4. Схема контактов РНКП с ДНК в промоторном комплексе *T. thermophilus* (Zhang et al., 2012). На схеме показана конструкция из олигонуклеотидов, имитирующая промоторную ДНК. Зелёным цветом отмечены контакты, которые образует осубъединица с ДНК, чёрным цветом - контакты кор-фермента с ДНК. Азотистые основания, которые выпетливаются из нематричной цепи ДНК и размещаются в белковых карманах, обведены в бирюзовую рамочку.

Установлено, что σ-субъединица взаимодействует с -12, -11, -9, -8 и -7 нуклеотидами -10-элемента. Узнавание дискриминатора происходит за счёт взаимодействий нуклеотидов с -6 по -4 с небольшим желобком, образованным районом σ1.2 (рисунок 2.4) (Zhang et al., 2012). В случае нуклеотидов в -11 и -7 положениях -10-элемента и в -6 положении дискриминатора происходит выворачивание азотистых оснований из цепи ДНК в белковые карманы, образованные остатками σ-субъединицы. Благодаря этому, азотистое основание может контактировать сразу с несколькими разными аминокислотными остатками. Во-первых, это позволяет с высокой специфичностью узнавать нуклеотиды в конкретном положении, т.к. формируются контакты кармана со всеми атомами азотистого основания. Во-вторых, это позволяет осуществлять плавление ДНК-дуплекса, что необходимо для формирования открытого промоторного комплекса (Feklistov and Darst, 2011; Zhang et al., 2012). Такой способ взаимодействий объясняет, почему позиции -11А и -7Т являются самыми важными в -10 элементе (раздел 2.3.1).

Самым большим сюрпризом, который преподнесла эта работа, стало открытие, что корфермент способен образовывать специфические контакты с азотистыми основаниями нематричной цепи на передней границе транскрипционного пузыря. Это происходит за счёт CRE-района β -субъединицы, который взаимодействует с основаниями с -4 по +2 положение нематричной цепи и тем самым, возможно, принимает участие в распознавании промотора. Наиболее необычными оказались взаимодействия с самым дальним основанием на границе промоторного комплекса – гуанином в +2 положении нематричной цепи ДНК (+2G), который выпетливается из цепи ДНК и размещается в глубоком кармане β -субъединицы (CRE-карман) где специфически взаимодействует с аминокислотными остатками вокруг себя (Zhang et al., 2012). Однако роль специфических взаимодействий между CRE-районом и нематричной цепью промоторного комплекса остаётся не ясной, т.к. выявить консенсус в этом регионе известных природных промоторов не удалось (Mitchell et al., 2003). Одним из возможных объяснений этому феномену является то, что такие контакты могут быть нужны для регуляции других стадий транскрипции.

Несмотря на высокое разрешение описанных выше двух структур, при кристаллизации были использованы короткие олигонуклеотиды, которые не воссоздают полную структуру транскрипционного пузыря и не проясняют природу контактов -35 элемента с РНКП в промоторном комплексе. Этот пробел компенсирует структура промоторного комплекса, образованного РНКП Е. coli (Zuo and Steitz, 2015). Данная работа также ценна тем, что подавляющее большинство биохимических данных по механизмам транскрипции было получено именно на РНКП *Е. coli*, но, несмотря на эти существенные преимущества, структура имеет значительно более низкое разрешение, чем выше описанная. Сравнение промоторных комплексов E. coli и T. thermophilus показывает, что они похожи, и узнавание -10-го элемента происходит сходным образом. На данной структуре не получилось увидеть на атомном уровне взаимодействия ДНК с удлинённым -10 и -35 элементами, но в общих чертах механизм их узнавания прояснился (рисунок 2.5). Можно видеть, что две перпендикулярные спирали доменов σ2 и σ3 входят в большой желобок ДНК удлинённого -10 элемента. В узнавании -35 элемента промотора принимает участие консервативный домен о4, мотив спираль-поворотспираль (НТН) которого проникает в большой желобок ДНК. Также установлено, что домен о4 взаимодействует с подвижной концевой спиралью домена flap β-субъединицы, что делает

возможным узнавание промоторов с различной длиной спейсера между -35 и -10 элементами (17 ± 2 нт).



Рисунок 2.5. Общий вид взаимодействий -35 и удлинённого -10 элементов (ТG-элемент) с РНКП в промоторном комплексе *E. coli* (Zuo and Steitz, 2015 с изменениями). На рисунке видно, что удлинённый -10 и -35 элементы промоторной ДНК находятся в двухцепочечном виде и их узнавание происходит за счёт того, что спирали σ -субъединицы проникают в большой желобок ДНК. Механизм распознавания -10 элемента промотора отличается, т.к. он находится в области транскрипционного пузыря в виде одноцепочечной ДНК. Остаток W433 σ субъединицы образует стэкинг-взаимодействия с -12-парой нуклеотидов и стабилизирует заднюю границу транскрипционного пузыря.

Таким образом, структурные исследования помогли значительно прояснить механизмы узнавания и плавления промотора.

2.3.3 Последовательность событий при инициации транскрипции

Инициация транскрипции у бактерий протекает в несколько этапов (Haugen et al., 2008; Murakami and Darst, 2003; Saecker et al., 2011). Особая роль в процессе инициации принадлежит σ-субъединице. По современным представлениям она выполняет следующие функции: способствует посадке кор-фермента около точки старта, осуществляет первичное плавление ДНК-дуплекса при формировании транскрипционного пузыря, подавляет неспецифическую инициацию транскрипции (инициацию не с промотора), взаимодействует с активаторами транскрипции и способствует связыванию инициаторных субстратов (Feklistov et al., 2014). Кроме того, σ-субъединица вовлечена в процесс ухода РНКП с промотора при переходе к элонгации транскрипции (Рироv et al., 2014).

Сначала формируется холофермент, в котором о-субъединица определяет предпочтение к промоторам (Gruber and Gross, 2003). Затем происходит узнавание холоферментом основных элементов промотора. РНКП связывается с ДНК и образует закрытый промоторный комплекс,

который обозначается как RPc. После этого происходят конформационные перестройки RPc, которые проходят через несколько промежуточных интермедиатов RPi, в ходе которых происходит разделение ДНК дуплекса в области около точки страта транскрипции, и образуется открытый промоторный комплекс RPo. Расплавленная область называется транскрипционным пузырём, задний край которого ограничен -10 элементом (расположен от -12 до -7 положений в большинстве промоторов), а передний +2 положением (Decker and Hinton, 2013; Saecker et al., 2011). Одной из ключевых задач при транскрипции является выбор точки старта. Обычно она располагается на расстоянии 7 или 8 нуклеотидов от -10 элемента (Shultzaberger et al., 2007). Комбинирование разных подходов, таких как анализ пространственных структур промоторного комплекса, ДНК-белковые сшивки, мутации в РНКП и глубокое секвенирование транскриптов показало, что последовательность от -6 до +4 нуклеотида играет основную роль при выборе точки старта (Winkelman et al., 2016b). Наличие G-богатого дискриминатора (GGG) и гуанина в +2 положении приводит к укорочению расстояния между -10 элементом и точкой старта (расстояние становится 6-7 нт. от края -10 элемента). С-богатый дискриминатор (ССС) и отсутствие последовательности СRE способствует сдвигу точки старта в направлении транскрипции (8-9 нт. от края -10 элемента). Мутации в РНКП, которые приводят к нарушению узнавания дискриминатора и CRE, также приводят к сдвигу точки старта в направлении транскрипции. Такие изменения коррелируют со сдвигом передней границы транскрипционного пузыря (Vvedenskaya et al.; Winkelman et al., 2016b).

В присутствии НТФ происходит превращение открытого промоторного комплекса RPo в инициаторный комплекс RPint. В это время происходит формирование первой фосфодиэфирной связи между НТФ, которые расположены в +1 и в +2 положениях, а также дальнейший рост РНК-транскрипта. Были расшифрованы структуры промоторных комплексов, содержащих короткий РНК-транскрипт, или инициаторный НТФ (Basu et al., 2014). Оказалось, что инициаторный нуклеотид (+1) занимает *i*-сайт в инициаторном комплексе, который соответствует сайту связывания 3'-конца в элонгационном комплексе (рисунок 2.6 А и раздел 2.4.4). При этом наблюдаются некоторые неспецифические взаимодействия, такие как солевые мостики между остатками Q567, Н999 β-субъединицы и γ-фосфатом, а также между К883 и, возможно, К846 β-субъединицы и α-фосфатом НТФ (в данной главе приведена нумерация thermophilus). Эти взаимодействия способствуют остатков РНКП Τ. правильному позиционированию субстрата в активном центре. Также выявлен остаток R704 β'-субъединицы, который взаимодействует с 2'-ОН и 3'-ОН группами рибозы (рисунок 2.6 Б). Предположительно, это может являться механизмом дискриминации НТФ и дНТФ РНКП. Все остатки, вовлечённые во взаимодействии с инициаторным АТФ, являются абсолютно

консервативными для РНКП из всех организмов, что свидетельствует в пользу единого механизма включения первого нуклеотида для всех клеточных многосубъединичных полимераз (Basu et al., 2014). Также было выявлено, что остаток G в -1 положении матричной цепи образует стэкинг-взаимодействия с аденином инициаторного $AT\Phi$ (это объясняет, почему в -1 положении матричной цепи многих промоторов часто расположен пуриновый нуклеотид, а наиболее распространённой точкой старта является +1А). Биохимические данные говорят о том, что такое взаимодействие нужно для стабилизации первого и второго НТФ в активном центре (Basu et al., 2014).

Для установления сайта посадки второго нуклеотида был использован негидролизуемый аналог ЦТФ цитидин-5'-[(α,β)-метилено]трифосфат (СМРСРР). Оказалось, что он взаимодействует с двумя остатками аргинина β-субъединицы (R557, R879) и R1029 β'- субъединицы. При этом TL приобретает более закрытую конформацию, чем в случае промоторного комплекса, но средняя часть TL (остатки со 1246 по 1251) остаётся неструктурированной (рисунок 2.6 A). Остатки M1238 и Q 1235 в TL взаимодействуют с 3'-OH группой второго нуклеотида.



Рисунок 2.6. Сайты связывания +1 и +2 нуклеотидов в инициаторном комплексе *T. thermophilus* (Basu et al., 2014). (А) Структура активного центра при включении первых двух нуклеотидов. (Б) Взаимодействия инициаторных нуклеотидов с матричной цепью ДНК и РНКП. На рисунках видно, что первые два НТФ размещаются в *i*- и *i*+1-сайтах и спариваются с матричной цепью ДНК. При этом азотистое основание +1 НТФ образует стэкингвзаимодействие с пуриновым азотистым основанием матричной цепи ДНК в +1 положении.

Во время роста транскрипта контакты с промотором сохраняются, что приводит к формированию комплекса с увеличенным размером расплавленного участка ДНК вплоть до 25 нуклеотидов (Kapanidis et al., 2006; Revyakin et al., 2006). Такой комплекс называется

напряжённым комплексом. Его структуру удалось расшифровать благодаря оригинальному который заключался в добавлении ограниченного набора HTΦ подходу, к закристаллизованному промоторному комплексу, что позволило получить инициаторный комплекс, содержащий РНК длиной 6 нуклеотидов (Basu et al., 2014). Оказалось, что в инициаторном комплексе РНК/ДНК гибрид находится в А-форме, при этом 3'-конец РНК находится в i+1-сайте, т.е. в претранслокационном положении (рисунок 2.7 и раздел 2.4.4). Это говорит о том, что в таком комплексе транслокация затруднена вследствие стерического препятствия, вызванного расположением района 3.2 осубъединицы на выходе транскрипта в РНК-выводящий канал. Такое затруднение транслокации приводит к возникновению паузы перед включением нуклеотида в +7 положении промотора *lac*UV5 (Duchi et al., 2016). Структуру кончика района σ3.2 не удаётся разрешить, что свидетельствует об отсутствии стабильных взаимодействий между РНК и районом 3.2 осубъединицы, вероятно, из-за электростатического отталкивания между трифосфатной группой транскрипта и отрицательно заряженными остатками этого района. При дальнейшем увеличении размера РНК район 3.2 осубъединицы выталкивается из активного центра, и транскрипт продвигается к выходу из фермента по РНК-выводящему каналу. Некоторые биохимические данные свидетельствуют о том, что наличие трифосфатной группы на 5'-конце способствует выталкиванию района 3.2 осубъединицы (Давид Дулин, личное сообщение).



Рисунок 2.7. Структура активного центра инициаторного комплекса Т. thermophilus, содержащего РНК-продукт длиной в 6 нт (Basu et al., 2014). На структуре видно, что РНКтранскрипт удерживается в активном центре благодаря формированию неспецифических контактов с РНКП. По достижению размера в 6нуклеотидов трифосфатная группа на 5'-конце сталкивается с районом 3.2 и дестабилизирует структуру его кончика (показана оранжевой пунктирной линией). Комплекс находится в претранслокационном состоянии. при этом TL центральная часть не структурирована (показана голубым пунктиром).

Как уже сказано выше, при синтезе транскрипта передний край РНКП сдвигается вперёд, а контакты -10 элемента промотора с районом 2 о-субъединицы сохраняются, что приводит к так называемому напряжённому состоянию. Напряжение в транскрипционном комплексе и наличие препятствия на пути выхода РНК может привести к смещению РНКП назад и к выбросу РНК-транскрипта (предположительно через вторичный канал) – так называемому абортивному синтезу (Carpousis and Gralla, 1980; Gross et al., 1998; Winkelman et al., 2016a; Winkelman and

Gourse, 2017), или к вытеснению района σ 3.2 из РНК-выводящего канала. Когда РНКП синтезирует транскрипт критической длинны (9-15 нт.), происходит удаление преграды на пути выхода РНК и рвутся контакты РНКП с промотором, что приводит к формированию элонгационного комплекса, от которого стохастически диссоциирует σ -субъединица (Krummel and Chamberlin, 1989; Mukhopadhyay et al., 2001; Straney and Crothers, 1985). Баланс между абортивным и продуктивным путём зависит от промотора и начальной транскрибируемой последовательности (Hsu, 2008). Всё вышесказанное можно обобщить следующей схемой (Haugen et al., 2008):

$R + P \leftrightarrow PCc \leftrightarrow RPi \leftrightarrow RPo \leftrightarrow RPint \rightarrow EC.$

При формировании открытого промоторного комплекса равновесие большинства изученных модельных промоторов смещено в сторону образования открытого комплекса, а после разрыва контактов с промоторов необратимо формируется элонгационный комплекс.

2.3.4 Альтернативные о-субъединицы

Количество осубъединиц у разных бактерий может быть от одной единственной – главной σ -субъединицы (обозначаются σ^A или σ^{70} в случае *E. coli*) до нескольких десятков. Главная о-субъединица способствует экспрессии генов домашнего хозяйства, которые активно экспрессируются во время быстрого роста. В отличие от главной, функции альтернативных осубъединиц заключаются в контроле экспрессии генов в ответ на стрессовые факторы или при морфологических преобразованиях клетки (Gruber and Gross, 2003). Можно заметить некоторую корреляцию между количеством σ-субъединиц и изменчивостью условий естественной окружающей среды. Так, виды, которые живут в условиях гомеостаза, например, внутриклеточные паразиты рода *Mycoplasma*, имеют одну единственную о-субъединицу. *E. coli*, которая обитает в кишечнике млекопитающих, имеет 7 σ-субъединиц. Возбудитель туберкулёза Mycobacterium tuberculosis, хоть и тоже обитает внутри организма, но сталкивается со значительным иммунным ответом, имеет 13 субъединиц. А свободноживущий почвенный микроорганизм Sorangium cellulosum имеет 109 о-субъединиц (Gruber and Gross, 2003; Han et al., 2013; Hu et al., 2014; Rhodius et al., 2006). Таким образом, появление альтернативных осубъединиц можно рассматривать как механизм адаптации к переменам в окружающей среде. В классической генетике существует удобный термин регулон, который обозначает набор генов, регулируемых одним и тем же регулятором (Maas and McFall, 1964). Одной из разновидностей регулона является сигмулон – группа генов, которая транскрибируется при участии одной и той же σ-субъединицы. Размер сигмулона может быть от одного единственного оперона, до всего транскрибируемого генома (Gruber and Gross, 2003; Paget, 2015). Сигмулоны разных осубъединиц могут значительно перекрываться (Maciag et al., 2011). У бактерии E. coli помимо главной есть ещё 6 альтернативных σ -субъединиц: σ^{54} (другое обозначение σ^{N}), σ^{38} (σ^{S}), σ^{32} (σ^{H}),

 σ^{28} (σ^{F} или FliA), σ^{24} (σ^{E}), σ^{19} (FecI). Из них 5 гомологичны главной σ-субъединице, а также узнают промоторы, которые устроены схожим образом. Эти факторы выделяют в σ^{70} семейство. σ^{54} -субъединица (σ^{N}) ни структурно, ни функционально не похожа на σ^{70} , она требует наличия белка-активатора, который связывается с энхансер-подобным участком, для плавления ДНК в области промотора использует АТФ, и запускает экспрессию генов при азотном голодании. Экспрессия и активность альтернативных σ -субъединиц контролируется на разных уровнях, но чаще всего на уровне трансляции и посттрансляционно, за счёт связывания специального анти- σ -фактора, который, как правило, предотвращает ассоциацию σ -субъединицы с кор-ферментом. Анти- σ -факторы используют различные механизмы для высвобождения σ -субъединицы в ответ на специфический стимул (Paget, 2015).

2.3.5 Классификация субъединиц σ^{70} -семейства

Первые попытки классификации всех известных σ -факторов были основаны на анализе последовательностей этих генов из разных организмов и были подкорректированы с учётом данных о пространственной структуре (Gruber and Gross, 2003). Эта классификация является самой распространённой, но подвергается некоторой методологической критике и, возможно, слегка устарела (Iyer and Aravind, 2012). Однако, если не рассматривать вопросы эволюции этих субъединиц, а подходить с точки зрения доменной и функциональной организации, то предложенная классификация вполне оправдана. Обычно выделяют 4 группы внутри σ^{70} -семейства (рисунок 2.8).

Группа 1. Главные σ -субъединицы абсолютно необходимы для роста, являются ортологами σ^{70} -субъединицы *E. coli* и выявлены у всех бактерий. Представители этой группы необходимы для экспрессии генов домашнего хозяйства во время стадии быстрого роста. Субъединицы этой группы устроены сложнее всего и состоят из 4-х консервативных доменов σ 1, σ 2, σ 3 и σ 4 (Lonetto et al., 1992). Субъединицы группы 1 являются эволюционными предшественниками для остальных групп внутри σ^{70} -семейства (Gruber and Gross, 2003).

Группа 2. Факторы этой группы не являются жизненно необходимыми для бактерий (по крайней мере, для *E. coli*) и очень похожи на первую группу, но утратили район $\sigma^{1.1}$. К этой группе относится σ^{38} (σ^{S}) *E. coli*. В ходе эволюции σ -субъединицы этой группы возникали многократно в результате дупликаций гена, кодирующего σ^{A} , видимо, независимо для каждой филогенетической группы. Это объясняет их сходство с главной σ -субъединицей, такое, что они могут узнавать её промоторы. Количество σ -субъединиц группы 2 может достигать несколько штук на организм. Так у *Streptomyces coelicolor* найдено 3 члена этого семейства, у цианобактерии *Synechocystis sp.* 6803 4 σ -субъединицы второй группы (Buttner and Lewis, 1992; Gruber and Gross, 2003). Функция субъединиц группы 2 лучше всего изучена на примере σ^{38} -субъединицы (σ^{S}) *E. coli*, которая ответственна за неспецифический ответ на стрессовые

факторы, метаболизм в стационарной фазе и при недостатке питательных веществ, а также ответ на осмотический шок (Battesti et al., 2011). У цианобактерий функции этой субъединиц шире, они вовлечены в регуляцию генов теплового шока, метаболизма сахаров и перехода на гетеротрофное питание при недостатке освещения (Osanai et al., 2008).



Рисунок 2.8. Доменная организация σ-субъединиц σ⁷⁰-семейства (Paget 2016 с изменениями). σ⁷⁰-семейство состоит из 4-х групп, все представители которых произошли от главной субъединицы путём утери районов на N-конце и района σ3 (у 4-й группы). Группы 2 и 3 похожи по доменной организации, но значительно различаются по последовательности.

Группа 3. Является большой и довольно гетерогенной, распадается на несколько филогенетических подгрупп, но все представители обязательно содержат районы σ^2 , σ^3 и σ^4 . Промоторы, которые узнаются холоферментами с σ -субъединицами этой группы, довольно сильно отличаются от промоторов, узнаваемых при участии субъединиц групп 1 и 2 (Koo et al., 2009a; Koo et al., 2009b). Представителями данной группы являются σ^{32} (σ^{H}) и σ^{28} -субъединицы (σ^{F} , FliA) у *E. coli*. Функции σ -субъединиц данной группы довольно разнообразные: ответ на тепловой шок (σ^{32}), обеспечение подвижности клетки путём образования жгутиков (σ^{28}), образование спор – споруляция (SigE, SigF, SigG, SigK у *Bacillus subtilis*).

Группа 4. Является самой большой по количеству и самой гетерогенной: внутри неё выделяют 43 филогенетически удалённых подгруппы (Staron et al., 2009). Такие σ -субъединицы имеют только районы σ^2 и σ^4 и, по-видимому, представляют пример минимально возможных функциональных σ -субъединиц. Часто в литературе их обозначают ECF (от английского Extra Cytoplasmic Functions), потому, что они отвечают за передачу сигналов, которые возникают на клеточной мембране или в периплазме (Lonetto et al., 1994). Такими сигналами могут быть денатурированные белки в периплазме (наиболее частый случай) или молекулы иммунной системы хозяина. Из этого правила известно исключение. Так, σ^{R} -субъединица *Streptomyces coelicolor* запускает транскрипцию генов в ответ на внутриклеточные стимулы (Helmann, 2002). У *E. coli* есть 2 σ -субъединицы этой группы: σ^{24} - и σ^{19} -субъединицы.

гены стрессового ответа, продукты экспрессии которых восстанавливают целостность клеточной поверхности при обнаружении в периплазматическом пространстве денатурированных белков (Alba and Gross, 2004). σ^{19} -субъединица контролирует экспрессию одного единственного оперона *fecABCD*, который кодирует транспортёр ионов железа внутрь клетки при недостатке данного элемента (Braun, 1997).

Иногда можно встретить сообщения о целесообразности выделения обособленной 5-й группы гомологов фактора TxeR *Clostridium difficule*, которую раньше относили к одной из подгрупп внутри 4-й группы. Устроены они схожим образом, но имеют большую скорость эволюции и отвечают за транскрипцию генов синтеза токсинов (Mani and Dupuy, 2001). Данное мнение не является общепринятым, и вопрос о точной классификации σ^{70} -семейства с учётом всех прочитанных геномов остаётся открытым.

Многие генетические болезнетворных исследования клинических штаммов микроорганизмов выявили, что альтернативные σ-субъединицы являются факторам вирулентности (Kazmierczak et al., 2005). Так, σ^{s} -субъединица влияет на патогенность таких опасных бактерий как Vibrio cholera (возбудитель холеры), Borrelia burgdorferi (возбудитель болезни Лайма), Salmonella enterica (возбудитель сальмонеллёза) (Elias et al., 2000). Примером адаптации, которая способствует выживанию фагоцитированных бактерии внутри макрофага, является использование систем защиты от активных форм кислорода, экспрессия которых находится под контролем σ^{E} -субъединицы. Такие механизмы обнаружены у *Haemophilus* influenzae (возбудитель пневмонии и менингита), S. enterica и, вероятно, у M. tuberculosis (Craig et al., 2002; Manganelli et al., 2004). Также выявлена связь альтернативных σ-субъединиц с патогенностью у бактерий родов Vibrio, Yersinia, Pseudamonas и Proteus (Kazmierczak et al., 2005).

Таким образом, изучение механизмов транскрипции с участием альтернативных σсубъединиц имеет не только фундаментальное значение, но имеет выход на прикладную науку и медицину.

2.4 Механизмы элонгации транскрипции

2.4.1 Структурные основы элонгации транскрипции

Стадия элонгации начинается с разрыва контактов РНКП с промотором, и до самой терминации РНК-транскрипт прочно удерживается в составе ЭК. В ходе данного этапа транскрипции происходит присоединение комплементарных матричной цепи ДНК НТФ к 3'концу РНК, которое сопровождается транслокацией - перемещением ЭК вдоль матрицы ДНК (Nudler, 2009). Полимеризация нуклеотидов не является единственной реакцией, которую катализируют РНКП. Известно ещё 4 других реакции, которые происходят в том же активном экзопирофосфоролиз, эндопирофосфоролиз, центре, что и полимеризация: ЭКЗО-И эндонуклеазное расщепление РНК (Sosunov et al., 2003). На сегодняшний день самые подробные данные о пространственной организации элонгационного комплекса бактериальной РНКП даёт работа, в которой расшифрована структура РНКП из бактерии *T. thermophilus*, которая содержит спереди ДНК дуплекс размером 14 п.н., РНК/ДНК гибрид размером 9 п.н., а также одноцепочечную РНК длиной 7 нуклеотидов. Такая конструкция из нуклеиновых кислот называется минимальной матрицей, которая хорошо зарекомендовала себя в качестве модельной системы в биохимических экспериментах (Vassylvev et al., 2007a). При образовании ЭК происходят значительные структурные перестройки по сравнению с холоферментом РНКП, которые обусловлены тем, что кор-фермент теперь формирует контакты с нуклеиновыми кислотами, а не с о-субъединицей. Наиболее значительным структурным перестройкам подвергаются домены в и в'-субъединиц, которые формируют главный канал, что приводит к уменьшению его диаметра и формированию поверхности, формирующей множество контактов с нуклеиновыми кислотами, что объясняет высокую стабильность и процессивность ЭК (рисунок 2.9).

Матричная цепь в элонгационном комплексе делает изгиб в виде практически прямого угла. В главном канале плотно упакован РНК/ДНК гибрид, который образует множество полярных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с β и β'-субъединицами. Такие взаимодействия нужны для выявления некомплементарной пары, что важно для обеспечения точности транскрипции. Как и предполагалось ранее, одноцепочечная РНК выходит на поверхность через РНК-выводящий канал. Любопытно, что 6 из 7 наблюдаемых азотистых оснований РНК в этом канале образуют стэкинг-взаимодействия друг с другом, и ход цепи сахарофосфатного остова напоминает А-форму дуплекса нуклеиновых кислот, причём лишь немногие нуклеотиды образуют водородные связи с белком. Эти факты указывают на то, что в РНК-выводящем канале формируются благоприятные условия для формирования регуляторных вторичных структур РНК, что важно для формирования некоторых транскрипционных пауз и терминации (Landick, 2006). Двухцепочечная ДНК спереди от активного центра начинается

сразу после изгиба (от +2 положения) и находится в В-форме. Спереди от активного центра наблюдается множество контактов с ДНК-дуплексом. Считается, что они нужны для правильного позиционирования ДНК в активном центре, обеспечения процессивности и эффективной транслокации.



Рисунок 2.9. Структура элонгационного комплекса T. thermophilus с минимальной матрицей (Vassylvev et al., 2007). Зелёным цветом указаны районы, положение которых (более 6Å) значительно изменяется по сравнению с холоферментом. Стрелками некоторые функциональные отмечены домены. Матричная цепь показана красным цветом, нематричная - синим, РНК - жёлтым цветом. Обращает на себя внимание, что нуклеиновые кислоты образуют множество контактов с РНКП, что делает ЭК очень стабильным.

Районы fork (вилка) и lid (крышка) поддерживают постоянный размер транскрипционного пузыря. На пути нематричной цепи в активный центр лежит район fork, который способствует разделению цепей ДНК по ходу транскрипции (рисунок 2.10 А). Задняя граница РНК/ДНК гибрида контактирует с петлёй "lid", которая стерически блокирует дальнейшее удлинение гибрида, что приводит к разъединению цепей и выходу транскрипта в РНК-выводящий канал (рисунок 2.10 Б). При этом происходит восстановление ДНК-дуплекса сзади по ходу транскрипции. Благодаря тому, что элементы, ограничивающие размер транскрипционного пузыря, имеют фиксированное положение в ЭК, его размер остаётся постоянным при транскрипции и составляет 12-15 п.н. (Korzheva et al., 2000; Nudler et al., 1997; Sidorenkov et al., 1998).

Растущий РНК-транскрипт спаривается с матричной цепью ДНК на протяжении 8-9 нуклеотидов. Размер РНК/ДНК гибрида остаётся строго постоянным после включения нового нуклеотида: удлинение 3'-конца на 1 нуклеотид и последующая транслокация РНКП сопровождается плавлением 1-й пары ДНК-дуплекса спереди по ходу транскрипции и разрушением 1-й пары РНК/ДНК гибрида и выходом одного нуклеотида в РНК-выводящий канал.



Рисунок 2.10. Структурные элементы, принимающие участие в поддержании размера транскрипционного пузыря (Vassylyev et al., 2007). Матричная цепь показана красным цветом, нематричная - синим, РНК-транскрипт - жёлтым. (А) Элемент fork (показан зелёным цветом) препятствует проникновению нематричной цепи в активный центр, что необходимо для плавления ДНК в направлении транскрипции. (Б) Элемент lid (показан синим цветом) взаимодействует с задней границей РНК/ДНК гибрида и способствует разделению дуплекса при транслокации, тем самым поддерживая размеры задней границы транскрипционного пузыря.

2.4.2 Связывание нуклеотидных субстратов и динамика активного центра

Большая часть пространства, которое соединяет область активного центра с окружающей средой в ЭК, занята нуклеиновыми кислотами (рисунок 2.9). Для объяснения того, как нуклеотидные субстраты попадают в активный центр РНКП, были предложены две модели. Согласно первой модели нуклеотиды поступают через узкий (но свободно сообщающийся с окружающей средой) вторичный канал, согласно второй - попадают через главный канал, причём, возможно, предварительно спариваясь с основаниями ДНК спереди от активного центра (Gong et al., 2005; Landick, 2005). Первая модель имеет следующие доказательства:

1) На структуре РНКП II удалось увидеть НТФ в области контакта активного центра и вторичного канала. Место связывания НТФ во вторичном канале получило название Е-сайт (от английского entry) (Westover et al., 2004).

2) Антибиотик микроцин J25, который связывается в области вторичного канала и занимает практически всё его пространство, подавляет включение НТФ (Adelman et al., 2004).

3) Компьютерные расчеты показывают, что диффузия НТФ через вторичный канал РНКП II позволяет осуществлять синтез РНК со скоростью 10-20 нт/с, что хорошо согласуется с экспериментальными данными (Batada et al., 2004).

Альтернативная модель имеет следующие экспериментальные обоснования:

1) Высокие концентрации НТ Φ , комплементарных *i*+2 и *i*+3 основаниям матричной цепи, стимулируют включение *i*+1 нуклеотида. Этот феномен был объяснён авторами тем, что

 $HT\Phi$ спариваются с основаниями матричной цепи в главном канале ещё до входа в активный центр (Burton et al., 2005; Gong et al., 2005; Holmes and Erie, 2003)

2) Высокие концентрации НТ Φ , комплементарных *i*+2 основанию матричной цепи, подавляют включение неправильных нуклеотидов в *i*+1 положении (Gong et al., 2005).

На сегодняшний момент подавляющее большинство исследователей склоняется к первой модели (Landick, 2005; Martinez-Rucobo and Cramer, 2013; Nudler, 2009; Vassylyev et al., 2007b). Тем не менее, в литературе не опубликованы экспериментальные данные, которые позволили бы полностью опровергнуть вторую гипотезу.

Так или иначе, НТФ проникает в область активного центра РНКП. При помощи кристаллизации ЭК в присутствии с негидролизуемого аналога субстрата АМРсРР (аденозин-5'-[(α,β)-метилено]-трифосфат) удалось на атомном уровне понять, как происходит связывание нуклеотидного субстрата. Оказалось, что даже комплементарный азотистому основанию матричной цепи НТФ вначале связывается в каталитически неактивном, так называемом преинсерционном состоянии, которое удалось зафиксировать и визуализировать на структуре в присутствии антибиотика стрептолидигина (Vassylyev et al., 2007b). В таком состоянии рибоза и трифосфатная группа удалены от 3'-конца РНК. Связывание субстрата в преинсерционном состоянии способствует изменению конформации TL, в результате чего петля принимает частично свёрнутую конформацию, но центральная её часть остаётся не структурированной. Для дальнейшего продуктивного роста транскрипта необходим переход в активное инсерционное положение, что сопровождается структурными перестройками в области активного центра (Vassylvev et al., 2007b). При этом происходит полное сворачивание TL в 2 анти-параллельные α-спирали (TH – trigger helix), которые вместе с рядом расположенной спиралью ВН образуют трёхспиральный пучок (рисунок 2.11 А). В результате такой перестройки происходит уменьшение просвета вторичного канала у входа в активный центр, что приводит к так называемому закрытому состоянию активного центра, которое препятствует выходу субстрата. Образование ТН способствует структурным изменениям близлежащих районов. В первую очередь это затрагивает район fork (рисунок 2.11 Б). Его перемещение является функционально значимым. N-концевая часть шпильки взаимодействует с *i*+2 парой, в то время как С-концевой район способствует сближению ДНК и нуклеотидного субстрата в ЭК.

Другой значимой перестройкой является сдвиг центральной части ВН, которая позиционируется между спиралями ТН. Такое перемещение ВН является ключевым для перестройки TL в TH, так как при этом формируется оптимальная сеть контактов внутри трёхспирального пучка, а также устраняется столкновение крупных аминокислотных остатков этих двух подвижных элементов.



Рисунок 2.11. Структура ЭК *Т. thermophilus* с минимальной матрицей в присутствии негидролизуемого аналога субстрата АМРсРР (Vassylyev et al., 2007b). (А) Общий вид ЭК в присутствии нерасщепляемого аналога АТФ. На структуре видно, что происходит конформационная перестройка ТL в TH (показана синими спиралями), в результате чего активный центр принимает закрытое каталитически активное инсерционное состояние. (Б) Перемещение элемента fork, которое стабилизирует инсерционное состояние. Голубым цветом показан район fork в ЭК, который не содержит НТФ, серым цветом обозначено его положение в ЭК с АМРсРР.

При связывании субстрата АМРсРР формирует классическую Уотсон-Криковскую пару с азотистым основанием матричной цепи, при этом он зажат между 3'-концом РНК и белковыми остатками ТН и ВL. Особенно значимыми являются контакты M1238 (TH, в данной главе используется нумерация остатков РНКП *T. thermophilus*) и T1088 (BH), которые контактируют с азотистым основанием входящего НТФ и азотистым основанием матричной цепи, соответственно. Эти контакты необходимы для правильного позиционирования комплементарного НТФ. Также входящий НТФ образует другие любопытные контакты (рисунок 2.12). Так, остаток N737 β '-субъединицы формирует водородные связи с атомами кислорода 2'- и 3'-гидрокислов рибозы, а R704 формирует водородную связь только с 3'-гидрокислом рибозы. Эти контакты необходимы для дискриминации НТФ и дНТФ.

Структурные данные о переходе активного центра в закрытое состояние подтверждаются биохимическими методами. Так, в опытах по быстрой кинетике включения нуклеотидов было обнаружено, что инактивация включения нуклеотидов магнийхелатирующим агентом ЭДТА происходит медленнее, чем остановка реакции соляной кислотой, которая вызывает денатурацию фермента (Gong et al., 2005; Nedialkov et al., 2003).



Рисунок 2.12. Схема контактов +1 нуклеотида матричной цепи и входящего НТФ в двух ракурсах (Vassylyev et al., 2007b). Матричная цепь ДНК показана красным, аналог субстрата - зелёным цветом. Видно, что когда в инсерционном положении находится комплементарный матричному основанию рибонуклеозидтрифосфат, образуются контакты, которые стабилизируют такой комплекс, тем самым обеспечивая точность транскрипции и селекцию дНТФ.

Также в опытах по короткой инкубации ЭК с радиоактивно-мечеными НТФ и последующему добавлению значительных избытков немеченого субстрата было показано, что комплексы значительно теряют способность к обмену субстратов, что хорошо объясняется наблюдаемым на структуре закрытием активного центра путём изменения структуры TL в TH (Kireeva et al., 2008). Считается, что такая мобильность активного центра нужна для осуществления дискриминации субстратов по кинетическим критериям. Если НТФ образует правильную пару с азотистым основанием матричной цепи, то он прочно удерживается в активном центре, и за это время происходит полное сворачивание TL и стабилизация её свёрнутого состояния за счёт взаимодействия с субстратом (Nudler, 2009; Vassylyev et al., 2007b). Эти взаимодействия хорошо видны на описанной структуре: остатки TH в закрытом состоянии формируют сеть контактов с HTФ, которая позволяет закрепить комплементарный матричному основанию субстрат в активном центре в благоприятной для катализа конформации. Помимо обеспечения точности транскрипции, закрытие вторичного канала необходимо для защиты активного центра от молекул воды во время катализа (Kireeva et al., 2012).

2.4.3 Механизм катализа включения НТФ в активном центре РНКП

Единый для всех полимераз механизм катализа присоединения нуклеотидных остатков был предложен Томасом Стайтсом. Центральным положением этого механизма является участие двух катионов магния, координированных остатками аспарагиновой кислоты, находящихся в активном центре. Согласно этой модели реакция присоединения нуклеотида происходит по S_N2 механизму. Первый ион MgI (также его часто обозначают MgA) активирует
3'-OH группу рибозы за счёт её депротонирования, с образованием 3'-O⁻ аниона, который атакует α-фосфат НТФ. Второй ион MgII (MgB) стабилизирует пятивалентный переходный комплекс и уходящий ион пирофосфата (Steitz, 1998).

К сожалению, ни биохимические, ни структурные данные по отдельности не могут пролить свет на события, которые происходят в активном центре до и вовремя формирования переходного комплекса. На помощь приходят методы молекулярной динамики и квантовой химии. Механизм катализа был детально промоделирован Марией Рамос с коллегами на основании структуры дрожжевой РНКП II (Carvalho et al., 2011). Принципиальным вопросом для приведённой выше модели Стайтса было установление протонакцепторного агента (который отнимает протон 3'-ОН группы рибозы), на роль которого потенциально могли бы претендовать атом кислорода α-фосфатной группы субстрата, свободный гидроксид-ион из раствора, связанный с первым ионом магния гидроксид или остатки активного центра РНКП. Методами молекулярной динамики была проведена оценка значений энергетических барьеров для перечисленных протонакцепторных групп. В результате был предложен следующий механизм включения НТФ РНКП (Svetlov and Nudler, 2013). На первом этапе свободный гидроксид-ион, пришедший из раствора, отнимает протон от 3'-гидроксила рибозы. В то же время происходит перенос протона с остатка H1085 TL в активном центре (соответствует H1238 у *T. thermophilus*) на кислород β-фосфатной группы НТФ. На втором этапе происходит нуклеофильная атака 3'-О' на атом Р α-фосфата, переходный комплекс стабилизируется при участии иона MgI. На третьем этапе НМФ присоединяется к 3'-концу РНК, а пирофосфат в протонированной форме покидает активный центр фермента, координируя второй ион Mg²⁺.

2.4.4 Механизм транслокации РНКП

Активный центр РНКП содержит два основных функциональных сайта (рисунок 2.13). Связывание нового НТФ происходит в i+1-сайте (от англ. insertion), а 3'-конца РНК – в i-сайте. Такое положение является каталитически активным, после формирования фосфодиэфирной связи РНК транскрипт удлиняется на один нуклеотид и 3'-конец РНК оказывается в i+1-сайте, где дальнейший синтез РНК уже невозможен. Для повторения процесса необходима транслокация, результатом которой является возврат 3'-конца в i-сайт, после чего фермент приобретает способность включить новый нуклеотид. Во время синтеза РНК ЭК постоянно осциллирует между посттранслокационным и претранслокационным состояниями (Brueckner and Cramer, 2008). Важно отметить, что энергия гидролиза НТФ не передаётся на прямую на какие-то мобильные элементы фермента, которые приводят РНКП в движение. Фермент передвигается как Броуновский храповик, который движется вперёд благодаря связыванию правильного субстрата в активном сайте, что стабилизирует фермент в активной конформации

и подавляет смещение в обратную сторону (Bar-Nahum et al., 2005; Brueckner and Cramer, 2008; Foster et al., 2001).



Рисунок 2.13. Схематическое изображение процесса транслокации РНКП (Bruckner and Cramer 2008, Nudler 2009 с изменениями и дополнениями). Пояснения в тексте.

Первая модель транслокации многосубъединичных полимераз была предложена в лаборатории Рождера Корнберга на основе сравнения пространственных структур бактериальной и дрожжевой РНКП. Было предположено, что изгиб ВН в сторону РНК/ДНКгибрида сопряжён с перемещением нуклеиновых кислот на один нуклеотид, а последующее восстановление исходной конформации освобождает место связывания субстрата для нового комплементарного НТФ (Epshtein et al., 2002; Gnatt et al., 2001). Методами РНК-белковых сшивок было показано, что конформация ВН в бактериальной РНКП действительно может меняться (Bar-Nahum et al., 2005). Было предположено, что ВН действует как возвратнопоступательная собачка, которая толкает РНКП вперёд относительно РНК/ДНК гибрида, в то

время как вторая неподвижная собачка (НТФ) предотвращает скольжение назад, причём эти собачки конкурируют за один и тот же сайт связывания субстрата. В дополнение можно сказать, что движение ВН не является автономным от других частей активного центра, оно контролируется путём изменения конформации TL, которая контактирует с субстратом (Brueckner and Cramer, 2008; Vassylyev et al., 2007b). Эти факты привели к возникновению дополненной модели, согласно которой изменения в конформации TL играют ключевую роль в транслокации РНКП (рисунок 2.13) (Bar-Nahum et al., 2005; Brueckner and Cramer, 2008). Включение правильного нуклеотида в *i*+1-сайт ограничивает латеральную диффузию РНКП и способствует изменению конформации TL в TH, благодаря чему происходит закрытие активного центра, и субстрат уже не может покинуть РНКП (раздел 2.4.2). Из этого следует, что сворачивание TL будет способствовать транслокации просто за счёт того, что ограничивается продвижение назад. Таким образом, можно сделать вывод, что важной функции TL, наряду с обеспечением включения нуклеотидов, является сопряжение синтеза РНК и транслокации (Bar-Nahum et al., 2005; Nudler, 2009). В пользу этой модели свидетельствуют структурные данные, полученные для комплекса РНКП II с α-аманитином. На этой структуре видно, что связывание этого токсина приводит к сдвигу центральной части ВН на 2,5 Å в сторону РНК/ДНК гибрида (рисунок 2.13). Такое перемещение приводит к тому, что *i*+1-сайт оказывается занятым, и может привести к передвижению гибрида относительно большей части фермента. По всей видимости, TL стабилизирует такую смещённую конформацию BH за счёт формирования "клина" рядом с ней. Следует отметить, что изогнутую конформацию ВН также наблюдали в структуре кор-фермента бактериальной РНКП и в случае определенных ЭК (Weixlbaumer et al., 2013; Zhang et al., 1999).

Таким образом, общую схему транслокации можно представить следующим образом (рисунок 2.13). Вновь входящий НТФ связывается в преинсерционном состоянии ЭК, который характеризуется открытой посттранслокационного конформацией TL. Структурное преобразование ТL в TH приводит к закрытию активного центра и переходу фермента в каталитически активное состояние. После реакции происходит высвобождение пирофосфата и переход TL в заклиненную конформацию, которая, в свою очередь, способствует сдвигу центральной части ВН, который сопровождается передвижением нуклеиновых кислот в промежуточное состояние (первый этап транслокации). В таком интермедиате место +1 матричного нуклеотида занято ВН, и комплекс находится в неактивном состоянии. Переход TL в открытое состояние и выпрямление ВН приводит к освобождению места для +1 матричного нуклеотида, основание матричного нуклеотида делает поворот на 90° и размещается в *i*+1-сайте (второй этап транслокации). Такой комплекс переходит в посттранслокационное состояние и способен связывать новый субстрат. Во время

транскрипции ЭК действует как хеликаза, расплетая дуплекс ДНК перед активным центром, и это расплетание происходит на первом этапе транслокации.

2.4.5 Обратная транслокация

Ранние биохимические исследования выявили неравномерные картины футпринтинга во время элонгации. Это привело к созданию модели, согласно которой во время продвижения по матрице ДНК РНКП растягивается и сжимается наподобие гусеницы-пяденицы (Krummel and Chamberlin, 1992). В то же время, было показано, что в целом РНКП относительно монотонно движется вдоль ДНК, а такие неравномерные перемещения наблюдаются только на некоторых последовательностях (Nudler et al., 1994). Это говорит о том, что вышеописанная гипотеза не может рассматриваться как универсальный механизм движения ЭК. Появилась альтернативная модель, согласно которой РНКП, не меняя своей геометрии, может самопроизвольно перемещаться в противоположном направлении относительно хода транскрипции, чем и объясняются наблюдаемые изменения в картинах футпринтинга (рисунок 2.14) (Komissarova and Kashlev, 1997a, b; Nudler et al., 1997). Она получила многочисленные экспериментальные подтверждения и сейчас является общепризнанной. Так, если использовать синтетические аналоги нуклеотидов, которые стабилизируют РНК/ДНК гибрид (образуют схожую по геометрии с Уотсон-Криковской парой, но имеют больше водородных связей), то формирование комплексов с нерегулярной картиной футпринтинга подавляется. Введение аналогов, которые образуют менее стабильные пары (и соответственно менее стабильный РНК/ДНК гибрид) приводит к появлению сайтов с нерегулярными картинами футпринтинга, которые не наблюдаются в системах с использованием природных нуклеотидов (Nudler et al., 1997). Использование РНК-олигонуклеотидов, которые комплементарны транскрипту и образуют РНК/РНК гибрид, который стерически препятствует смещению РНКП назад, также подавляет формирование нерегулярных картин футпринтинга (Komissarova and Kashlev, 1997а). И наконец, были получены несколько структур ЭК дрожжевой РНКП II и РНКП из Т. thermophilus в смещённом состоянии (Cheung and Cramer, 2011; Sekine et al., 2015; Wang et al., 2009).

Эти и многие другие данные привели к модели так называемой обратной транслокации (в англоязычной литературе этот феномен называется backtracking - бэктрэкинг). Смещение РНКП в противоположном направлении наблюдается, когда образование смещённого РНК-ДНК гибрида оказывается энергетически более выгодным (обычно более ГЦ-богатый гибрид), но в некоторых случаях дополнительно стимулируется формированием напряжённых комплексов, например, при уходе с промотора или при образовании некоторых пауз транскрипции (Landick, 2006).



Рисунок 2.14. Схема активного (сверху) и смещённого (снизу) комплексов (Nudler 2012 с изменениями). На некоторых последовательностях ДНК или при включении неправильного нуклеотида РНКП смещается в направлении, противоположном транскрипции, при этом 3'-конец РНК покидает активный центр и размещается во вторичном канале.

Поскольку размер РНК/ДНК гибрида должен оставаться постоянным (вследствие довольно жёстких структурных элементов, ограничивающих его размер), при обратном смещении 3'-конец РНК выходит из активного центра во вторичный канал. Разумеется, такой комплекс становится неактивным для реакции полимеризации (Nudler, 2012). Структурные исследования смещенного комплекса показали, что дополнительным фактором, который стабилизирует такое состояние, является взаимодействие 3'-конца РНК со вторичным каналом. РНК образует контакты с одной стороны со вторичным каналом, а с другой стороны с TL, которая принимает неописанную раннее конформацию, и приоткрывает выход из вторичного канала в активный центр (Cheung and Cramer, 2011). Аналогичные конформационные преобразования TL наблюдали и в смещённом комплексе бактериальной РНКП. Также изменяется положение BH, которая теперь располагается между TL и 3'-концом РНК, покинувшим активный центр (Sekine et al., 2015). Для реактивации смещённых комплексов у бактерий есть транскрипционные факторы Gre, которые стимулируют расцепление РНК прямо в активном центре РНКП, за счёт того, что приносят в активный центр второй ион Me^{2+} ,

связанный с консервативными остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот. У *E. coli* есть два таких фактора: GreA и GreB (Borukhov et al., 1993; Sosunova et al., 2003).



Рисунок 2.15. Сравнение пространственных структур ЭК РНКП II *S.cerevisiae* в активном (рисунок А) и смещённом (рисунок Б) положениях (Cheung and Cramer 2011 с изменениями). На рисунке видно, что при переходе в смещённое положение 3'-конец РНК покидает активный центр и переходит во вторичный канал.

В случае включения неправильного рибонуклеотида также может происходить обратная транслокация ЭК (Imashimizu et al., 2015; Kulish et al., 2000; Zenkin et al., 2006). В таких комплексах происходит расщепление транскрипта, которое стимулируется факторами Gre, в результате чего фрагмент РНК, содержащий неправильный нуклеотид, вырезается, и РНКП возобновляет транскрипцию. Данное явление является механизмом коррекции включения правильных нуклеотидов в клетке во время транскрипции (Imashimizu et al., 2015). У эукариот есть транскрипционный фактор TFIIS, который выполняет ту же функцию, что и Gre белки, хотя не родственен им по последовательности и структуре (Martinez-Rucobo and Cramer, 2013).

Формирование смещённых комплексов можно рассматривать как фундаментальное свойство РНКП, которое важно не только для регуляции процесса транскрипции путём изменения её скорости, точности, эффективности терминации и антитерминации, но и сопряжённых с транскрипцией процессов, таких как укладка и процессинг РНК-транскриптов, трансляция, репарация и репликация (Nudler, 2012; Proshkin et al., 2010).

2.5 Механизм формирования транскрипционных пауз

2.5.1 Общие представления о транскрипционных паузах

Ещё на заре изучения механизмов транскрипции было обнаружено, что процесс элонгации в системах *in vitro* не является монотонным включением нуклеотидов в растущую

цепь РНК и сопровождается остановками синтеза транскрипта (Maizels, 1973). Дальнейшие исследования показали, что временные остановки синтеза РНК наблюдаются при транскрипции многих генов фагов и бактерий, причём исследователи заметили связь, что паузы детектируются в регуляторных районах, что позволило предположить, что они играют важную биологическую функцию (Gardner, 1982; Hauser et al., 1985; Winkler and Yanofsky, 1981). Во многих случаях транскрипционные паузы запрограммированны последовательностью ДНК и сопряжены со структурными перестройками элонгационного комплекса. Ранее считалось, что транскрипционные паузы происходят во время стадии элонгации, но недавние исследования выявили их даже во время абортивного синтеза на стадии инициации транскрипции (Duchi et al., 2016). Кроме того, паузы могут происходить вследствие включения некомплементарных нуклеотидов, что важно для исправления ошибок транскрипции (James et al., 2017). Последовательность ДНК, которая вызывает паузу, называется сигналом паузы. Генетические, биохимические данные, а также исследования, проведённые на единичных молекулах РНКП, показывают, что сигнал большинства пауз состоит из нескольких частей. Транскрипционные паузы обладают одним важным фундаментальным свойством – дихотомией узнавания сигнала паузы, которая заключается в том, что только часть элонгационных комплексов формирует паузы (Landick, 2006). Вследствие этого, паузу можно количественно охарактеризовать двумя величинами:

- 1. Максимальная эффективность узнавания (образования) паузы доля ЭК, перешедших в состояние паузы.
- 2. Продолжительность паузы, которая выражается либо с помощи константы скорости выхода из состояния паузы k_e , либо с помощью времени полужизни паузы $t_{1/2}$. Учитывая, что распад паузы происходит по уравнению для реакции первого порядка, время полужизни находится по формуле $t_{1/2} = \ln 2/k_e$ (Artsimovitch and Landick, 2000).

На основании биохимических исследований были выделены следующие разновидности транскрипционных пауз у бактерий:

- 1. Консенсусные паузы, найденные при полногеномном анализе ЭК РНКП *Е. coli*, которые вызванны последовательностью ДНК с консенсусом G₋₁₀Y₋₁G₊₁.
- 2. Шпилько-зависимые паузы, формирование которых зависит от вторичной структуры РНК в виде шпильки.
- 3. Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией ЭК. В эту группу пауз входят, в частности, *ops*-паузы и о-зависимые паузы.
- 4. Паузы на стадии инициации транскрипции.

В литературе сообщалось о существовании ещё одного вида пауз во время транскрипции с промотора A1 бактериофага T7. В состоянии данной паузы ЭК находится в посттранслокационном состоянии, что отличает её от всех других пауз (Kireeva and Kashlev, 2009). Однако, механизм формирования данных пауз остаётся плохо изученным.

2.5.2 Механизм формирования транскрипционных пауз

Принято считать, что при образовании большинства пауз РНКП сначала переходит в короткоживущее неактивное состояние - так называемая элементарная пауза, - которое затем стабилизируется тем или иным способом (Herbert et al., 2006; Landick, 2006). Формирование элементарной паузы, вероятно, стимулируется последовательностями, сходными с сигналами консенсусных пауз (Zhang and Landick, 2016). Переход в состояние элементарной паузы происходит не со 100% эффективностью. Но если РНКП переходит в состояние паузы, то продолжительность паузы может быть увеличена как за счёт структурных перестроек в РНКП, так и за счёт её нестандартных взаимодействий с нуклеиновыми кислотами, а также за счёт привлечения дополнительных транскрипционных факторов (Landick, 2006; Weixlbaumer et al., 2013).

Структуру транскрипционного комплекса в состоянии элементарной паузы расшифровали и сравнили со структурой активного ЭК. Оказалось, что в состоянии паузы различные районы фермента подвергаются изменениям, порой довольно значительным (Weixlbaumer et al., 2013). Структура ЭК в состоянии паузы (ЭКП) имеет более открытую конформацию домена clamp, чем канонический ЭК, и скорее напоминает свободный корфермент РНКП (Weixlbaumer et al., 2013). Это приводит к тому, что большинство контактов с передним ДНК-дуплексом оказываются разорванными (рисунок 2.16).

Как и ожидалось, структурным перестройкам подвергается и активный центр РНКП. На структуре видно (рисунок 2.17), что 3'-конец РНК занимает *i*-сайт активного центра (посттранслокационное состояние), но доступ азотистого основания матричной цепи ДНК к *i*+1-сайту закрыт заклиненной конформацией спирали ВН, из-за чего не возможно продуктивное спаривание с входящим НТФ. В структуре обычного ЭК ВН имеет практически прямую конформацию, которая не мешает проникновению матричного основания ДНК и входящего НТФ в активный центр. Открытие домена clamp также приводит к расширению РНК-выводящего канала. Моделирование показывает, что в таком расширенном канале может легко уместиться РНК-шпилька, но в обычном ЭК есть стерические препятствия для её образования (Weixlbaumer et al., 2013).

Таким образом, на основании структурных данных был предположен механизм формирования элементарной паузы. Свободный кор-фермент имеет состояние с открытым доменом clamp, что соответствует наиболее энергетически выгодному состоянию (Weixlbaumer

et al., 2013; Zhang et al., 1999). Во время транскрипции в ЭК конформация с закрытым доменом стабилизируется белок-нуклеиновыми контактами.



Рисунок 2.16. Сравнение структур элонгационного комплекса (ЭК) и элонгационного комплекса в состоянии элементарной паузы (ЭКП) (Weixlbaumer et al., 2013). (А) Вид со стороны РНК выводящего канала. (Б) Вид со стороны главного канала. На рисунке представлено наложение структур ЭК и ЭКП. Матричная цепь показана оранжевым цветом, нематричная - синим, РНК - чёрным. Видно, что в состоянии элементарной паузы (ЭКП) домен сlamp и прилегающий к нему неконсервативный домен β'-субъединицы (β'NCD) принимает открытую конформацию (изображено зелёным цветом), по сравнению с ЭК (жёлтый цвет). При этом происходит потеря контактов РНКП с передним дуплексом ДНК.

При транслокации старые контакты рвутся и формируются новые. Во время транслокации у РНКП может принять более открытое состояние, аналогично свободному кор-ферменту, что наблюдается для элементарной паузы. Такое открытое состояние приводит к изменению конформации ВН и переходу АЦ в неактивное состояние. Также происходит раскрытие РНКвыводящего канала, что благоприятно для формирования шпильки, которая может стабилизировать такую конформацию (Weixlbaumer et al., 2013).

2.5.3 Консенсусные паузы

Консенсусные паузы были открыты недавно с помощью метода NET-seq (от английского native elongation transcript sequencing, секвенирование нативных элонгационных транскриптов). Данный метод заключается в том, что из клеток выделяли РНКП с ассоциированными с ней нуклеиновыми кислотами. Далее пробы депротеинизировали и выделяли РНК, которые затем подвергали глубокому секвенированию и анализу числа прочтений. Как оказалось, транскрипционные паузы происходят довольно часто, примерно одна пауза на сотню нуклеотидов. Выравнивание сайтов пауз позволило выявить чёткий консенсус в сигнале паузы $G_{.10}Y_{.1}G_{+1}$, где -1 положение соответствует 3'-концу РНК. Следует отметить, что позиции -10, - 1 и +1 являются наиболее консервативными, но также в формирование сигнала паузы вносят вклад позиции -11, -9, -3, -2 и с +2 по +9 (Imashimizu et al., 2015; Larson et al., 2014; Vvedenskaya et al., 2014; Zhang and Landick, 2016).



Рисунок 2.17. Сравнение структур активного центра РНКП ЭКП и ЭК (Weixlbaumer et al., 2013). (А) Структура активного центра РНКП в ЭКП. ВН (зелёный) принимает заклиненную конформацию и стерически блокирует попадание +1 нуклеотида матричной цепи (на рисунке отмечен +1) в активный центр и частично занимает место входящего НТФ (их позиции в ЭК показаны красным пунктиром). (Б) Структура активного центра в ЭК с субстратом. ВН имеет практически прямую конформацию и матричный нуклеотид и НТФ расположены в оптимальном для катализа положении.

Консенсусные паузы являются самыми распространёнными и самыми просто устроенными паузами. В опытах *in vitro* было показано, что такой сигнал паузы могут узнавать РНКП филогенетически далёких от E. coli организмов: Rhodobacter sphaeroides, Mycobacterium bovis, РНКП II B. taurus (Larson et al., 2014). Механизм паузирования на таких последовательностях был предложен в двух работах (Larson et al., 2014; Vvedenskaya et al., 2014). Как известно, размер РНК/ДНК гибрида остаётся постоянным в ходе транскрипции (раздел 2.4.1). Это приводит к тому, что для прохождения транслокации необходим разрыв водородных связей на краях РНК/ДНК дуплекса. Поскольку пара оснований в ДНК в +1 положении разделяется при транслокации, наличие ГЦ-пары увеличивает величину энергетического барьера транслокации по сравнению с АТ-парой, тем самым способствуя образованию паузы. Аналогичные рассуждения можно применить и к -10 нуклеотиду на задней границе гибрида, где тоже происходит плавление, и наличие более тугоплавкой пары способствует формированию паузы. Кроме того, гетеродуплекс 5'-rG-rN-3'/3'-dC-dN-5' является более стабильным, чем 5'-rC-rN-3'/3'-dG-dN-5, и наличие пары rG:dC в позиции -10 увеличивает энергетический барьер для транслокации по сравнению с парой rC:dG (Sugimoto et al., 1995). Также известно, что активный центр имеет разное сродство к РНК/ДНК-дуплексу в зависимости от его последовательности. Так, *i*- и *i*+1-сайты предпочтительно взаимодействуют с последовательностью 5'-rR-rY-3'/3'-dY-dR-5' (где R - остаток пуринового основания, Y пиримидинового), что приводит к тому, что наличие Ү в -1 позиции и G в +1 увеличивают

энергетический барьер при транслокации, тем самым способствуя образованию паузы (Hein et al., 2011). И действительно, биохимическими исследованиями показано, что ЭК в состоянии консенсусной паузы находится в претранслокационном состоянии (из-за высокого энергетического барьера транслокации) (Larson et al., 2014). Также показано, что взаимодействия остатка +1G в сигнале паузы с CRE-карманом стимулируют транслокацию и тем самым способствуют выходу ЭК из состояния консенсусной паузы (Vvedenskaya et al., 2014).

В одной работе было показано, что консенсусные паузы неравномерно распределены по геному, и часто локализованы в начале транслируемых районов РНК. Это происходит благодаря тому, что один из остатков G последовательностью Шайна – Дальгарно (AGGAGG) и находящийся через несколько нуклеотидов старт кодон (ATG) приводят к возникновению сигнала консенсусной паузы. Было предположено, что эти паузы управляют укладкой 5'нетранслируемого региона в пространственные структуры с доступной для рибосомы последовательностью Шайна – Дальгарно, но экспериментальные доказательства этой гипотезы пока отсутствуют (Larson et al., 2014). В то же время, более поздняя работа не выявила повышения частоты локализации консенсусных пауз около стартового кодона ATG (Imashimizu et al., 2015). Таким образом, биологическая функция таких пауз не установлена и является предметом дискуссий.

2.5.4 Инициаторная пауза

При исследовании механизмов перехода от инициации к элонгации на промоторе *lac*UV5 методами работы с единичными молекулами установили, что при достижении PHK-продуктом размера в 6-нуклеотидов происходит довольно длительная пауза. Она возникает из-за того, что PHK-транскрипт "упирается" в район σ 3.2 и дальнейшая транслокация затрудняется (Duchi et al., 2016). Действительно, если сделать делецию района σ 3.2, то пауза ослабевает, но не исчезает полностью. Было показано, что такая пауза стимулируется ещё и сигналом консенсусной паузы в последовательности ДНК в +6 положении (Bauer et al., 2016). Биологическая роль такой паузы пока остаётся не ясной, но, возможно, она нужна для перестроек инициаторного комплекса при переходе к элонгации.

2.5.5 Паузы, сопровождаемые обратной транслокацией

Как было сказано выше, обратная транслокация РНКП приводит к переходу ЭК в неактивное состояние, из-за того, что 3'-конец РНК выходит за пределы активного центра. Оказалось, что переход ЭК в смещённое состояние может стимулироваться определёнными сигналами пауз. Один из таких сигналов был открыт *in vivo* при изучении влияния транскрипционного фактора RfaH на гены, которые содержат консервативный сайт *ops* (<u>operon</u> <u>polarity</u> <u>suppressor</u>) в начале транскрибируемого участка (Leeds and Welch, 1997). Затем данные

паузы были охарактеризованы in vitro. Оказалось, что паузы, которые происходят на таких последовательностях (их принято называть ops-паузами), имеют сложную структуру: при их формировании нет одной чёткой позиции остановки транскрипции, пауза состоит из набора продуктов близкой длины. Мажорные продукты паузы находятся в смещённом положении, т.е. 3'-конец РНК покидает активный центр и таким образом пауза стабилизируется (Artsimovitch and Landick, 2000). Биологическая функция таких пауз хорошо известна. Во время паузы нематричная цепь с сигналом *орs* позиционируется на поверхности ЭК и узнаётся фактором RfaH. который также взаимодействует с кор-ферментом РНКП. RfaH подавляет транскрипционные паузы в ходе дальнейшей транскрипции и способствует прохождению ЭК последовательностей терминаторов. Такие паузы не являются очень распространёнными, всего в геноме E. coli найдено 17 сайтов ops и 2 сайта в F-плазмиде, однако, участвуют в регуляции экспрессии генов факторов патогенности, таких как гемолизин (Artsimovitch and Landick, 2000). Есть также сообщение, что ops-паузы способствуют репарации повреждений ДНК по ходу транскрипции в системах in vitro, за счёт привлечения фактора Mfd (Haines et al., 2014). Это позволяет полагать, что такие паузы являются многофункциональными регуляторными элементами.

Другим известным примером пауз, которые сопровождаются обратной транслокацией, являются σ-зависимые паузы. Согласно классической схеме транскрипции, во время инициации при переходе от абортивного синтеза к элонгации осубъединица должна диссоциировать (Feklistov et al., 2014). Однако, появились убедительные данные о том, что о-субъединица может оставаться в составе элонгационного комплекса. Более того, она является не просто бесполезным попутчиком, а полноправным участником регуляции экспрессии генов на стадии элонгации. Феномен σ-зависимой паузы был впервые описан при исследовании регуляции транскрипции поздних промоторов лямбдоидных фагов, где σ-зависимая пауза наблюдалась в начальном участке транскрибируемых генов (Rees et al., 1997; Ring et al., 1996). При образовании паузы σ-субъединица узнаёт последовательность -10-подобного элемента в нематричной цепи, которая может быть дополнена TG и -35-подобными элементами (Devi et al., 2010; Nickels et al., 2002; Zhilina et al., 2012). Причём эти взаимодействия с промотор-подобным элементом не приводят сразу к паузе. РНКП способна включить ещё несколько нуклеотидов, но поскольку сзади она связана с ДНК через σ-субъединицу, то происходит сдвиг только передней границы фермента, в то время как задний конец остаётся "заякоренным". В результате образуется напряжённый комплекс, параметры которого (длина расплавленного участка ДНК) отличаются от канонического ЭК. Это механическое напряжение может привести либо к диссоциации σ -субъединицы, либо к обратной транслокации комплекса и переходу в состояние паузы (Perdue and Roberts, 2011; Zhilina et al., 2012). Продолжительность паузы может быть

увеличена элементарной паузой, которая возникает при удлинении РНК и образовании напряжённого комплекса (Strobel and Roberts, 2015).

Как уже было сказано выше, для формирования о-зависимых пауз необходимо наличие в составе элонгационного комплекса σ-субъединицы. В связи с этим возникает вопрос: та ли же самая молекула о-субъединицы, которая принимала участие в образовании промоторного комплекса, остаётся связанной с ЭК и участвует в образовании паузы (механизм in cis) или после её диссоциации присоединяется другая молекула (механизм in trans)? Ранние работы in vitro указывают на реализацию механизма in cis (Marr et al., 2001). Однако, позже стали появляться данные, что к свободному от о-субъединицы элонгационному комплексу может присоединяться другая молекула осубъединицы, которая способна вызывать такие паузы (Brodolin et al., 2004). Было установлено, что при увеличении концентрации свободной осубъединицы происходит увеличение эффективности образования σ-зависимой паузы *in vitro* (Deighan et al., 2011). Аналогичные эксперименты проводились в системе in vivo путём гиперэкспрессии σ-субъединицы с плазмиды. В них было продемонстрировано, что увеличение концентрации о-субъединицы в клетке приводит к увеличению эффективности о-зависимой паузы, что указывает на реализацию in trans механизма. Наиболее показательным был опыт, когда под контроль промотора *tar* P (промотор альтернативной σ^{28} -субъединицы, который был выбран, чтобы полностью исключить σ^{70} -зависимую паузу по механизму *in cis*, т.к. при его реализации в составе ЭК находилась бы σ^{28} -субъединица) были поставлены сигналы σ^{70} зависимой паузы. Оказалось, что σ^{70} -субъединица способна присоединяться к ЭК по механизму in trans и вызывать транскрипционную паузу. Таким образом, реализуются механизмы как in *cis*, так и *in trans*. Оба механизма могут работать совместно на σ^{70} -зависимых промоторах, что приводит к увеличению содержания ЭК с σ^{70} -субъединицами (Goldman et al., 2015).

Существует только одна доказанная биологическая функция σ-зависимых пауз. У лямбдоидных фагов во время σ-зависимой остановки транскрипции в промотор-проксимальном регионе происходит присоединение фагового транскрипционного фактора Q к РНКП, который делает ЭК нечувствительным к сигналам терминации, благодаря чему происходит синтез полноразмерного транскрипта. Для присоединения фактора Q к РНКП необходим сигнал в ДНК, расположенный между -35 и -10 элементами промоторного комплекса. В промоторном комплексе такой сигнал скрыт холоферментом РНКП. Для того, чтобы сделать его доступным для фактора Q, необходимо немного сдвинуть полимеразу по ходу транскрипции, однако, быстрый переход к элонгации приведёт к тому, что фактор Q не сможет одновременно взаимодействовать с сигналом в ДНК и молекулой РНКП. Таким образом, σ-зависимая пауза служит барьером, который не даёт РНКП уйти слишком далеко от сигнала связывания белка Q (Perdue and Roberts, 2011; Rees et al., 1997; Roberts et al., 1998). Также было обнаружено, что σ-

зависимые паузы встречаются не только в генах бактериофагов, но и в начале оперонов у *E. coli* (Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2004). Было продемонстрировано, что σ -зависимые паузы встречаются в значительной части (10-20%) случайно выбранных промоторов *E. coli* (Deighan et al., 2011; Hatoum and Roberts, 2008). Также известно, что не только РНКП *E. coli*, но и РНКП *T. aquaticus* и *D. radiodurans* способны опознавать сигналы σ -зависимых пауз (Agapov et al., 2017; Zhilina et al., 2011). Учитывая, что σ -зависимые паузы открыты у филогенетически далёких организмов, а также потому, что они довольно распространены у *E. coli*, можно предположить, что они могут иметь важную регуляторную функцию, которая пока остаётся не известной.

2.5.6 Шпилько-зависимые паузы

Шпилько-зависимые паузы являются одними из самых хорошо изученных пауз. Открыты они были в начальных участках оперонов his, trp, thr, leu, ilvBN, ilvGNEDA биосинтеза аминокислот (Artsimovitch and Landick, 2000; Chan and Landick, 1993; Chan et al., 1997; Landick, 1997; Landick et al., 1985; Landick et al., 1996; Winkler and Yanofsky, 1981). Типичной и наиболее хорошо изученной паузой этого типа является пауза в опероне биосинтеза гистидина, которую называют *his*-паузой. Ещё ранние биохимические эксперименты показали, что сигнал паузы довольно сложно устроен и состоит из 3-х частей: последовательности, которая образует короткую РНК-шпильку (5 нуклеотидов спариваются и образуют стебель шпильки, а 8 нуклеотидов образуют петлю шпильки), 10-11-ти нуклеотидного района между шпилькой и 3'-концом РНК, и примерно 14 нуклеотидов спереди от активного центра. При этом каждый район сигнала паузы вносит свой аддитивный вклад в её формирование (Chan and Landick, 1993; Chan et al., 1997). Биохимические исследования продемонстрировали, что во время *his*-пауз 3'-конец РНК находится в претранслокационном состоянии, но не спаривается с матричным основанием РНК, а также ингибируется конформационный переход TL в TH, который необходим для включения нуклеотида (Nayak et al., 2013; Toulokhonov et al., 2007; Zhang et al., 2010). Оба эффекта могут быть результатом стабилизации открытой конформации clamp РНК-шпилькой, которая способствует домена сдвигу равновесия от посттранслокационного состояния в элементарной паузе к претранслокационному в his-паузе (Hein et al., 2014; Weixlbaumer et al., 2013). Биологическая функция таких пауз вытекает из их положения в гене. Сильные шпилько-зависимые паузы были выявлены перед аттенюаторами оперонов биосинтеза аминокислот. Аттенюаторы регулируют экспрессию генов путём регуляции вторичной структуры РНК-транскрипта при помощи транслирующей рибосомы (рисунок 2.18). Положение рибосомы на тандемных повторах кодонов аминокислот, которые синтезируются при участии продуктов генов регулируемого оперона, зависит от концентрации соответствующей аминоацил-тРНК (а их концентрация, в свою очередь, зависит от количества данной аминокислоты в клетке). Шпилько-зависимая пауза способствует тому, что рибосома

успевает осуществить инициацию лидерного пептида и догоняет РНКП. Далее рибосома регулирует вторичную структуру РНК в зависимости от своего положения. При этом возможно два сценария. Когда в клетке высокая концентрация соответствующей аминоацил-тРНК, рибосома быстро проходит последовательность лидерного пептида и встаёт на стоп-кодоне, такое положение благоприятно для формирования РНК-шпильки, которая вызывает терминацию транскрипции. Когда в клетке низкий уровень данной аминоацил-тРНК, продвижение рибосомы по тандемным кодонам происходит медленно и формируется альтернативная вторичная структура, которая препятствует терминации (Chan and Landick, 1989; Kolter and Yanofsky, 1982; Landick et al., 1985).



Рисунок 2.18. Обобщённая модель аттенюации оперонов биосинтеза аминокислот (Kolter and Yanofsky 1982). Последовательность аттенюаторов имеет 4 региона с обращёнными повторами, которые могут образовывать альтернативные вторичные структуры. В зависимости от скорости трансляции, рибосома способна контролировать вторичную структуру транскрипта. В районе 1 тандемно располагаются кодоны аминокислоты, оперон биосинтеза которой находится спереди по ходу транскрипции. Когда в клетке достаточно данной аминокислоты (A), рибосома синтезирует лидерный пептид до конца и останавливается на стоп-кодоне, при этом районы 3 и 4 образуют шпильку, которая приводит к терминации транскрипции. Когда в клетке мало аминокислоты (Б), рибосома останавливается на тандемных кодонах и район 2 остаётся открытым и спаривается с районом 3, в результате чего образуется последовательность антитерминатора и транскрипция продолжается. (В) Структура транскрипта в отсутствие трансляции. Как можно видеть, без трансляции всегда будет происходить терминация транскрипции, что делает паузу перед последовательностью аттенюатора (на рисунке не показана) необходимой для синхронизации транскрипции и трансляции перед данной регуляторной последовательностью.

Другим интересным примером регуляции экспрессии генов при помощи шпилькозависимых пауз является оперон mgtA, который кодирует гены транспортёра иона Mg^{2+} у al., 2014). В транскрибируемой РНК энтеробактерий (Hollands et закодирован рибопереключатель. Рибопереключателями называют цис-регуляторные элементы РНК, которые контролируют экспрессию генов за счёт изменения пространственной структуры молекулы при взаимодействии с низкомолекулярными лигандами (Howe et al., 2015; Nudler and Mironov, 2004). Когда РНКП останавливается на шпилько-зависимой паузе во время транскрипции оперона mgtA, есть два варианта событий. При высокой концентрации Mg²⁺ образуется вторая шпилька, которая дополнительно стабилизирует паузу по неизвестному

механизму (по мнению авторов данной работы, такая пауза является самой долгоживущей из всех известных у бактерий). За время пребывания РНКП на этой сильно-стабилизированной паузе ЭК догоняет р-фактор, который вызывает преждевременную терминацию (см. раздел 2.6). При низких концентрациях Mg²⁺ вторая шпилька не образуется и ЭК выходит из состояния паузы до взаимодействия с р-фактором, в результате синтезируется полноразмерный транскрипт. Таким образом, данная шпилько-зависимая пауза нужна для задержки ЭК во время оценки концентрации внутриклеточного содержания ионов магния за счёт образования альтернативных вторичных структур транскрипта. Также эта пауза служит примером паузы, наблюдаемой при р-зависимой терминации (Hollands et al., 2014). Подобные механизмы регуляции показаны для ribDEAHT оперона Bacillus subtilis, который кодирует оперон биосинтеза флавинмононуклеотида (Wickiser et al., 2005). Также есть сообщения о похожем влиянии шпилько-зависимых пауз на регуляцию генов btuB, thiM, $alx \in coli$, но они нуждаются в дополнительных исследованиях (Nechooshtan et al., 2014; Nechooshtan et al., 2009; Perdrizet et al., 2012). Таким образом, шпилько-зависимые паузы играют важную роль в регуляции экспрессии генов, участвующих в сложных и энергетически затратных биосинтетических путях и процессах, на уровне элонгации транскрипции.

2.6 Общие представления о терминации транскрипции

Терминация является заключительной и наименее изученной стадией транскрипции. Под терминацией обычно понимают процесс диссоциации элонгационного комплекса, который происходит на последовательностях, которые называются терминаторами или сайтами терминации, и сопровождается высвобождением РНК, РНКП и ДНК. Многосубъединичные полимеразы являются очень процессивными ферментами, расстояние между промотором и терминатором у бактерий может достигать десятков тысяч нуклеотидов (Santangelo and Artsimovitch, 2011). Эта стадия транскрипции имеет следующие биологические цели:

- предотвращение экспрессии нижележащих генов,

- создание возможности для транскрипции в обратном направлении,
- возвращение РНКП в транскрипционный цикл,

- минимизация вероятности столкновений ЭК с репликативной вилкой, что снижает вероятность образования двухцепочечных разрывов в ДНК (Ray-Soni et al., 2016).

Существует две разновидности терминации: фактор-зависимая и фактор-независимая. Для протекания фактор-независимой терминации не обязательно наличие вспомогательных транскрипционных факторов. Она происходит за счёт взаимодействий ЭК комплекса с нуклеиновыми кислотами, но её эффективность может дополнительно усиливаться фактором NusA (Ha et al., 2010; Peters et al., 2011). В фактор-зависимую терминацию вовлечены дополнительные белки, такие как АТФ-зависимая хеликаза р (Roberts, 1969). Иногда фактор-

зависимой терминацией называют также процесс диссоциации ЭК на повреждённой ДНК, который протекает при участии фактора репарации Mfd (Selby and Sancar, 1993). Сигналы фактор-зависимой терминации идентифицированы на концах от 50 до 80% РНК *E. coli* (Cardinale et al., 2008).

В обоих механизмах терминации обязательно присутствует транскрипционная пауза, которая служит временным окном для перехода от элонгации к терминации (Landick, 2006). В данной работе мы сфокусируем своё внимание на фактор-независимой терминации. Хорошо охарактеризованы сайты фактор-независимой терминации, которые, когда транскрибируются в РНК, образуют ГЦ-богатую шпильку (рисунок 2.19). Размер стебля шпильки в среднем составляет 8 п.н., петли шпильки - от 3 до 10 нт. В состав сигнала фактор-независимой терминации обязательно входит У-богатый район длиной 7-8 нт., который расположен в области РНК/ДНК гибрида (У-тракт), причём 3 остатка У, которые сразу примыкают к шпильке, наиболее консервативны (d'Aubenton Carafa et al., 1990). Показано, что поотдельности эти составляющие сигнала не могут вызывать эффективную терминацию (d'Aubenton Carafa et al., 1990).



Рисунок 2.19. Схема модельного фактор-независимого терминатора λtR2 (Peters et al., 2011). На рисунке видно, что сигнал терминатора состоит из двух частей, самокомплементрарной последовательности, которая приводит к образованию РНК-шпильки, и У-богатой последовательности (У-тракт). У-тракт имеет две части: дистальную (показана синим цветом), которая важна для формирования паузы, и проксимальную, с которой начинается разрушение РНК/ДНК гибрида.

Одной из главных трудностей фактор-независимой терминации является то, что нужно быстро дестабилизировать чрезвычайно стабильный ЭК без затрат внешней энергии (Wilson and von Hippel, 1994). Прежде всего, во время терминации происходит пауза на У-тракте (Gusarov and Nudler, 1999; Yarnell and Roberts, 1999). В её формировании играет особенную роль 3'-концевой У в РНК, замены которого приводят к исчезновению паузы и отсутствию терминации (Gusarov and Nudler, 1999). Затем РНК-транскрипт формирует шпильку, которая важна для дальнейшего протекания терминации, а также, возможно, стабилизирует элементарную паузу. Теоретически, У-богатая последовательность способствует обратной транслокации, но маловероятно, что это происходит в клетке, т.к. РНК-шпилька препятствует смещению ЭК назад (Komissarova et al., 2002). Таким образом, одна из функций шпильки – предотвращение бэктрэкинга. Возможно, при формировании паузы на У-тракте происходит потеря многих контактов РНКП с нуклеиновыми кислотами, аналогично изменениям,

наблюдаемым при формировании элементарной паузы (см. выше), что делает ЭКП менее стабильным, чем ЭК, и тем самым значительно облегчает диссоциацию комплекса.

Образование шпильки происходит в две стадии (рисунок 2.20). Зарождение вторичной структуры происходит благодаря быстрому спариванию нуклеотидов, которые расположены близко к петле шпильки. Вторая стадия происходит, когда отжигаются 2-3 пары нуклеотидов, расположенные ближе всего к гибриду. Спаривание этих нуклеотидов в шпильку затруднено потому, что -10 нуклеотид РНК находится в Sw3-кармане РНК-выводящего канала, а -9 нуклеотид входит в состав РНК/ДНК гибрида и взаимодействует с петлёй lid, что создаёт энергетический барьер для формирования полноценной шпильки (Lubkowska et al., 2011). Полностью сформированная шпилька способствует плавлению ближайших к ней 3-4 нуклеотидов РНК/ДНК гибрида, которые чаще всего представлены легкоплавкими парами rU:dA (Gusarov and Nudler, 1999).



Рисунок 2.20. Схема структурных преобразований нуклеиновых кислот при терминации (Ray-Soni et al., 2016 с изменениями). При переходе в состояние элементарной паузы ЭК находится в посттранслокационном состоянии. При этом -11 нуклеотид РНК размещается в SW3-кармане, а -10 пара РНК/ДНК гибрида стабилизируется взаимодействием с петлёй lid. Формирование шпильки способствует разрушению этих контактов и плавлению нескольких ближайших нуклеотидов в гибриде. При этом дальнейшее разрушение структуры комплекса может происходить двумя способами: путём проскальзывания гибрида (левая нижняя картинка) или путём гипертранслокации (правая нижняя картинка).

Механизм этого процесса не понятен. Информация о дальнейшем развитии событий тремя ограничивается моделями. Первая гипотеза предполагает, что происхолит гипертранслокация ЭК, т.е. перемещение на 2-4 нуклеотида относительно позиции терминации по направлению транскрипции без включения нуклеотидов в РНК транскрип (Larson et al., 2008; Santangelo and Roberts, 2004; Yarnell and Roberts, 1999). Вторая гипотеза предполагает сдвиг или проскальзывание РНК в РНК/ДНК гибриде из-за механических движений шпильки (Komissarova et al., 2002). Третья модель предполагает инвазию РНК-шпильки в активный центр, что сопряжено с масштабными структурными перестройками ЭК (Epshtein et al., 2007). Эксперименты на единичных молекулах показали, что возможна реализация первых двух механизмов в зависимости от последовательности U-тракта. Если U-тракт содержит одну или более ГЦ-пар, то вероятнее происходит гипертранслокация, если гибрид менее крепкий (содержит только АУ-пары), то вероятнее происходит проскальзывание (Larson et al., 2008).

Заключительным этапом терминации является диссоциация комплекса. Этому способствует сразу несколько фактов. Во первых, rU:dA гибрид сам по себе является легкоплавким (Martin and Tinoco, 1980). Его дальнейшая дестабилизация происходит за счёт роста шпильки на втором этапе её формирования и это сопровождается дальнейшим разрушением гибрида. Причём гибрид в состоянии паузы теряет часть контактов с ЭК, что, вероятно, дестабилизирует его. В литературе нет работ, в которых бы описывались события дальнейшего разрушения гибрида и высвобождения транскрипта и РНКП.

Механизм р-зависимой терминации охарактеризован хуже. Во время элонгации р-фактор садится на РНК в области так называемых *rut* (<u>r</u>ho <u>ut</u>ilization) сайтов. Эти пиримидин-богатые РНК-сайты имеют размер около 30 нт., которые могут находится на расстоянии нескольких сотен нуклеотидов от места терминации. Сайты р-зависимой терминации проявляют малое сходство между собой. Это указывает на то, что такой механизм необходим для терминации генов, приобретённых путём горизонтального переноса (Cardinale et al., 2008; Leela et al., 2013).

2.7 Заключение по обзору литературы

На основании опубликованных работ можно сказать, что процесс транскрипции консервативен у всех клеточных организмов и тщательно регулируется на всех стадиях. Известно много случаев, когда регуляция экспрессии генов осуществляется благодаря транскрипционным паузам, которые могут возникать как во время инициации, так и во время элонгации и при терминации. Существование транскрипционных пауз доказано *in vivo*. Есть много данных, что некоторые паузы влияют не только на транскрипцию, но и на другие важные клеточные процессы, такие как трансляция, репликация и, возможно, репарация повреждений в ДНК. Однако, молекулярные механизмы узнавания сигналов пауз остаются малоизученными.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Бактериальные штаммы

В работе были использованы следующие штаммы E. coli:

a) DH 5α (Invitrogen) (генотип: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1) – для выделения плазмидной ДНК, молекулярного клонирования, а также в экспериментах по определению выживаемости клеток на среде с антибиотиком рифампицином.

б) BL21 (DE3) (*Novagene, USA*) (генотип: *F- ompT hsdS_B* (*r_B- m_B-) gal dcm D(srl-recA)* 306::*Tn10 (tet^R) (DE3)*) – для гиперэкспрессии рекомбинантных белков. Данный штамм содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора.

в) RL585 (предоставлен И. Арцимович) (генотип: *F- leu(Am) trp(Am) lacZ2110(Am) galK(Am) galE rpsL tsx supD43*, 74(Ts) *rpoBcI(Am) sueA t* Δ (*recA-srl)306 srl-301::Tn10-84*) – для определения способности РНКП с мутациями в гене *rpoB*, экспрессируемых с плазмиды, поддерживать рост клеток. Данный штамм содержит стоп-кодон Am в гене *rpoB*, находящемся на хромосоме, и температурочувствительную тРНК, которая способна спариваться с последовательностью стоп-кодона и препятствует терминации трансляции (Landick et al., 1990).

Г) К-12 MG1655 (Генотип *F*- lambda- *ilvG*- *rfb*-50 *rph*-1) – для экспериментов по измерению влияния замены в сигнале σ^{38} -зависимой паузы на экспрессию нижележащих генов.

Название плазмиды	Описание плазмиды	Источник
pIA545	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> , кодирующий β-субъединицу РНКП <i>E. coli</i> дикого типа, на 5'-конце гена <i>rpoB</i> закодирован кластер из 6 кодонов His	предоставлена И. Арцимович
pIA679	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i>	предоставлена И. Арцимович
pIA679MX_rpoB_W183A	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i> , ген <i>rpoB</i> (β-субъединица) содержит замену W183A и 6 кодонов His на 5'-конце	получена И.А. Басс (Petushkov et al., 2015)

3.2. Плазмиды

pIA679MX_rpoB_D446A	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i> , ген <i>rpoB</i> (β-субъединица) содержит замену D446A и 6 кодонов His на 5'-конце	получена И.А. Басс (Petushkov et al., 2015)
pIA679MX_rpoB_E546A	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i> , ген <i>rpoB</i> (β-субъединица) содержит замену E546A и 6 кодонов His на 5'-конце	получена И.А. Басс (Petushkov et al., 2015)
pIA679MX_rpoB_Δ443-451	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i> , ген <i>rpoB</i> кодирует β-субъединицу РНКП с делецией кодонов с 443 по 451 и вставкой пяти кодонов глицина в месте делеции, также содержит 6 кодонов His на 5'-конце	получена Д.М Есюниной (Petushkov et al., 2015)
pIA545_rpoB_Δ533-546	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> , кодирующий β-субъединицу РНКП <i>E.</i> <i>coli</i> с делецией кодонов с 533 по 546 и вставкой трех кодонов глицина в месте делеции, также содержит 6 кодонов His на 5'-конце	получена в данной работе
pIA679MX_rpoB_Δ533-546	плазмида содержит гены <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>rpoZ</i> , кодирующие все субъединицы кор-фермента РНКП <i>E</i> . <i>coli</i> , ген <i>rpoB</i> кодирует β-субъединицу РНКП с делецией кодонов с 533 по 546 и вставкой трех кодонов глицина в месте делеции, также содержит 6 кодонов His на 5'-конце	получена в данной работе
pIA226	плазмида содержит клонированный промотор P_R фага λ и терминатор <i>his</i> T из гистидинового оперона <i>E. coli</i>	предоставлена И. Арцимович
pTZ19 T7A1 tR2	плазмида содержит клонированный промотор T7A1 и терминатор tR2 фага λ	ЛМГМ
pGEM-T 226-146	плазмида на основе вектора pGEM-T, несущая вставку фрагмента гена <i>гроВ</i> длиной 500 п.н. под контролем промотора λP _R	предоставлена Д.М. Есюниной (Esyunina et al., 2015)
pBAD_rpoB	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> , кодирующий β-субъединицу РНКП <i>E. coli</i> дикого типа под контролем арабинозного промотора	получена Д.М. Есюниной (Petushkov et al., 2015)

pBAD_rpoB_D446A	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> , кодирующий β-субъединицу РНКП <i>Е. coli</i> с заменой D446A под контролем арабинозного промотора	получена в данной работе
pBAD_rpoB_E546A	плазмида содержит ген <i>гроВ</i> , кодирующий β-субъединицу РНКП <i>Е. coli</i> с заменой E546A под контролем арабинозного промотора	получена в данной работе
pBAD_rpoB_∆443-451	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> РНКП <i>E.</i> <i>coli</i> , кодирующий β-субъединицу с делецией кодонов с 443 по 451 и вставкой пяти кодонов глицина в месте делеции под контролем арабинозного промотора	получена в данной работе
pBAD_rpoB_Δ533-546	плазмида содержит ген <i>rpoB</i> РНКП <i>E.</i> <i>coli</i> , кодирующий β-субъединицу с делецией кодонов с 533 по 546 и вставкой трёх кодонов глицина в месте делеции под контролем арабинозного промотора	получена в данной работе
pET29_rpoS	плазмида содержит ген <i>rpoS</i> РНКП <i>Е. coli</i> , кодирующий σ ³⁸ -субъединицу	получена Д.М. Есюниной (Petushkov et al., 2017)
pET29_rpoS_L117F	плазмида содержит ген <i>rpoS</i> РНКП <i>E.</i> <i>coli</i> , кодирующий σ ³⁸ -субъединицу с мутацией L117F	получена в данной работе
pET28_ <i>rrnB</i> P1_ <i>luxCDABE</i>	плазмида содержит оперон <i>luxCDABE</i> люциферазы из бактерии <i>Photorhabdus</i> <i>luminescens</i> под контролем промотора <i>rrnB</i> P1	получена Д.М. Есюниной
pET28_ <i>adhE</i> P1_ <i>luxCDABE</i>	плазмида содержит оперон <i>luxCDABE</i> люциферазы из бактерии <i>P. luminescens</i> под контролем промотора <i>adhE</i> P1 и регуляторных районов, ассоцированных с промотором (позиции от -164 до +56 относительно точки старта данного промотора)	получена в данной работе
	плазмида содержит оперон <i>luxCDABE</i>	

Название белка	Кем предоставлено	Метод получения и очистки
σ ⁷⁰ -субъединица <i>E.coli</i>	Д.М. Есюнина	Pupov et al., 2014
σ ³⁸ -субъединица дикого типа <i>E.coli</i>	Д.М. Есюнина	как описано в пункте 3.16
σ ³⁸ -субъединица Δ228-234 (Δ3.2) <i>E.coli</i>	Д.М. Есюнина	как описано в пункте 3.16
GreA E.coli	Д.М. Есюнина	Laptenko and Borukhov 2003
GreB E.coli	Е. Сосунова	Laptenko and Borukhov 2003
ΡΗΚΠ β Δ443-451	Д.В. Пупов	как описано в пункте 3.15
PHKΠ β W183A	Д.В. Пупов	как описано в пункте 3.15

3.3 Препараты белков, предоставленные сотрудниками ЛМГМ

3.4. Питательные среды и антибиотики

В качестве жидкой питательной среды использовали среду LB (1% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl). Для получения твердых сред в нее добавляли 1,8-2% агара. Антибиотики добавляли до концентраций: ампициллин (Amp) 200 мкг/мл, канамицин (Km) 50 мкг/мл, рифампицин 20 мкг/мл или 50 мкг/мл (в зависимости от эксперимента). При проведении экспериментов по индукции экспрессии генов, находящихся под индуцибельным *lac*-промотором, с целью получения белков, кодируемых этими генами, в среду добавляли IPTG до концентрации 1 мМ. При проведении экспериментов по определению выживаемости бактерий, экспрессирующих с плазмиды мутантные β-субъединицы PHKП под контролем индуцируемого арабинозного промотора, в среду добавляли арабинозу до конечной концентрации 0,2%.

Для получения компетентных клеток использовали среду SOB (2% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта, NaCl 8,5 мM, KCl 2,5 мM). После растворения всех компонентов среду титровали 5M NaOH до pH 7,0. После автоклавирования в среду добавляли предварительно простерилизованный 1 M MgCl₂ до конечной концентрации 20 мM.

Для экспериментов по измерению влияния замены в сигнале σ³⁸-зависимой паузы на экспрессию нижележащих генов использовали среду LB, содержащую 100 мМ буфера MOPS (морфолинопропансульфоновая кислота), pH 7,4, 0,2% глюкозу.

3.5. Компетентные клетки и трансформация бактерий

Для получения компетентных клеток бактерии высевали на чашку Петри со средой LB и выращивали в течение 14 часов при 37 °C (для всех штаммов, кроме RL585, который выращивали в течение 24 часов при 30 °C). Клетки сеяли стерильной платиновой петлёй в 100 мл среды SOB и растили при комнатной температуре (21-23 °C) при постоянном помешивании 200 об./мин до оптической плотности 0,45 (оптическую плотность измеряли при длине волны 600 нм). Культуру охлаждали во льду в течение 10 минут, а затем центрифугировали 15 минут в центрифуге Eppendorf 5804R со скоростью 5000 об./мин при температуре 4 °C. Супернатант

удаляли, клетки ресуспендировали в 32 мл охлажденного буфера ТР (состав указан ниже) и инкубировали во льду 10 минут. После центрифугирования в тех же условиях клетки суспендировали в 8 мл буфера ТР и добавляли по каплям при постоянном перемешивании на льду DMSO (диметилсульфоксид) до конечной концентрации 7%. Полученную суспензию клеток делили на аликвоты по 100 мкл и немедленно замораживали в жидком азоте. Клетки хранили в кельвинаторе при температуре -70 °C. Химическую трансформацию компетентных клеток проводили следующим образом. Около 0,1 мкг плазмидной ДНК (или 3,5 мкл лигазной смеси) прибавляли к 35 мкл компетентных клеток и инкубировали при 0 °C 30 минут. После этого клетки подвергали тепловому шоку при 42 °C в течение 45 с., затем помещали в лёд на 2 минуты, далее добавляли 0,8 мл предварительно прогретой до 37 °C среды LB и инкубировали 45 мин при 37 °C, после чего высевали на чашки Петри с твердой питательной средой, содержащей нужный антибиотик. Для наращивания биомассы выросшие через 14-16 часов колонии высевали в жидкую среду и растили клетки при перемещивании при 37 °C (клетки штамма RL585 растили при 30 °C).

<u>Буфер ТР:</u> 10 мМ PIPES (пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота)), 15 мМ CaCl₂, 250 мМ KCl, титровали 4М KOH до pH 6,7. После этого добавляли 1 М MnCl₂ до конечной концентрации 55 мМ. Полученный раствор стерилизовали путём фильтрования через 0,22 µМ фильтр (Milipore).

3.6. Выделение плазмидной ДНК

Для большинства экспериментов выделение плазмид проводили коммерческим набором Thermo Fisher Scientific в соответствии с рекомендациями производителя. Когда требовалась наработка большого количества плазмиды, выделение плазмидной ДНК производили по методике (Sambrook et al., 1989) с изменениями. Ночную культуру объёмом 100 мл охлаждали во льду и центрифугировали 10 мин. при 5000 об./мин. Осадок клеток суспендировали в 1,6 мл раствора "А" с лизоцимом (Хеликон), выдерживали 30 мин. при 0 °С, затем добавляли 3,2 мл рра "В", осторожно перемешивали и выдерживали 5 мин. при комнатной температуре. Наблюдалось просветление суспензии и появление вязкости. После этого добавляли 2,4 мл 3 М ацетата калия pH 4,8, смесь инкубировали 10 мин при 0 °С. Появлялся хлопьевидный осадок, который удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 5000 об./мин. (в центрифуге Еррепdorf 5804R). Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 1,5 мл 50% ПЭГ 6000 (полиэтиленгликоль), раствор инкубировали во льду 30 мин. Полученный после центрифугирования (10 мин., 4000 об./мин.) осадок растворяли в 0,5 мл воды. Далее к препарату добавляли 0,375 мл насыщенного раствора LiCl и инкубировали во льду 10 мин. Центрифугировали при 5000 об./мин в течение 5 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость переносили в пробирку Eppendorf. Далее добавляли 0,5 мл изопропанола, замораживали в жидком азоте в течение 1 мин. После оттаивания раствор центрифугировали при 14000 об./мин в течение 15 мин при температуре 4 °C на центрифуге Eppendorf 5415R. Надосадочную жидкость сливали и промывали дважды 70% этанолом. Спирт сливали, остатки жидкости со стенок осаждали в настольной центрифуге Microspin FV-2400, и отбирали автоматической пипеткой. Осадок высушивали при комнатной температуре, после чего растворяли в буфере TE. Для очистки от PHK препарат обрабатывали PHKазойA (Fermentas) в 1[×] буфере Fast Digest (Thermo Fisher Scientific) при 37 °C. Затем образец переосаждали этанолом, растворяли в буфере TE. Качество препарата оценивали с помощью аналитического фореза в 1-1,5% агарозе (Sigma) в трис-боратном буфере (TBE) с добавлением бромистого этидия в гель.

<u>Раствор "А"</u>: 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 20 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкоза; 5 мг/мл лизоцим (добавляется непосредственно перед работой)

<u>Раствор "В"</u>: 200 мМ NaOH; 1% ДНС (додецилсульфат натрия, готовится непосредственно перед употреблением при 20°С).

<u>Буфер ТЕ</u>: 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0 и 0,1 мМ ЭДТА.

<u>Буфер ТВЕ</u>: 0,089М Трис-борат, pH 7,9, 0,002 М ЭДТА.

3.7. Выделение геномной ДНК Е. coli

Выделение геномной ДНК *E. coli* проводили коммерческим набором Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя.

3.8. Рестрикция ДНК

Расщепление ДНК рестриктазами проводили согласно рекомендациям фирмпроизводителей. Использовались рестриктазы фирмы Fermentas. Рестрикцию плазмидной ДНК проводили в рекомендованном производителем для каждой рестриктазы буфере в объеме 15 – 100 мкл, содержащем 0,2-10 мкг ДНК, в течение 1-12 часов при 37 °C. Реакцию останавливали прогреванием в течение 15 мин. при 65 °C. Перед электрофорезом в пробы добавляли 1/5 объема раствора бромфенолового синего, содержащего 50% глицерина с 0,1 М ЭДТА.

3.9. Выделение ДНК из агарозного геля

Для выделения необходимого фрагмента ДНК (ПЦР-продукта или рестриктного фрагмента) ДНК разделяли с помощью электрофореза в агарозе (1-2%), скальпелем вырезали кусок геля, содержащий нужный фрагмент. ДНК выделяли с помощью реактивов, входящих в набор фирмы Fermentas для выделения и очистки ДНК из гелей, в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для ПЦР-амплификации фрагментов генов с целью последующего клонирования применяли высокоточную полимеразу iProof (Bio-Rad). Для наработки ДНК в препаративных количествах с целью использования в качестве матрицы для транскрипции использовали полимеразу Pfu (Fermentas). Условия амплификации подбирали путём аналитической ПЦР с градиентом температуры отжига от 50 °C до 65 °C на приборах GeneAmp PCR-System9700 (PE Applied Biosystems) или Eppendorf Mastercycler Gradient. Размер продукта, его чистоту и количество оценивали путём электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Более подробно условия амплификации приведены ниже для каждого конкретного случая.

3.10.1. Получение промоторных фрагментов ДНК

Большинство промоторных фрагментов ДНК для транскрипции *in vitro* было получено методом ПЦР. Реакцию проводили обычно в объеме от 20 мкл, реакционная смесь содержала 1-кратный буфер (Fermentas), dNTP в концентрации 200 мкМ, 0,03 пмоль/мкл ДНК-матрицы, по 1 пмоль/мкл каждого из праймеров. Реакцию проводили с помощью Pfu ДНК-полимеразы (Fermentas). В реакцию брали 1-2 единицы активности (e.a.) полимеразы. Стандартная программа ПЦР включала в себя следующие стадии: первичное плавление 98 °C 5 мин, плавление 98 °C - 30 с, отжиг праймеров 55 °C - 40 с, синтез 72 °C – 40 с, количество циклов ПЦР - 25. Последовательности всех праймеров приведены в приложении 1.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие промотор T7A1 и его варианты, получали с использованием прямого праймера T7A1 LRI и обратного T7A1 HindIII. Для получения промотора T7A1 дикого типа (T7A1 WT) в качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду pTZ19 T7A1 tR2. Для получения промотора T7A1, содержащего замену +2T→G (T7A1+2G), в качестве матрицы использовали синтетический олигонуклеотид T7A1+2G. Амплификацию проводили с использованием полимеразы Pfu (Fermentas) в описанных выше условиях.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие модифицированный промотор *rrnB* P1* с заменой -7С \rightarrow G получали методом ПЦР с использованием прямого праймера rrnBP1_IRI и обратного rrnBP1_rHIII. Для получения промотора с единственной модификацией -7G (*rrnB* P1*) в качестве матрицы использовали синтетический олигонуклеотид rrnBP1-7G. Для получения варианта промотора *rrnB* P1* с заменой +2C \rightarrow G (*rrnB* P1*+2G) использовали синтетический олигонуклеотид rrnBP1-7G. Для получения варианта промотора *rrnB* P1* с заменой +2C \rightarrow G (*rrnB* P1*+2G) использовали синтетический олигонуклеотид rrnBP1-7G+2G.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие сигналы *his*-пауз (*his*P) под контролем промотора λPR, получали с использованием прямого праймера λPR-left, выбор обратного

праймера зависел от того, какую замену в сигнале *his*-пауз мы хотели получить. Для получения матрицы с сигналом *his*P дикого типа использовали праймер HisP WT, для получения матрицы с сигналом *his*P +1C использовали праймер HisP+1C. В качестве матрицы использовали плазмиду pIA226.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие промотор T7A1 и терминатор tR2 фага λ, получали с использованием прямого праймера bio-left1 и обратного right2. В качестве матрицы использовали плазмиду pTZ19 T7A1 tR2.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие промотор *adhE* P1 и его варианты, получали с использованием прямого праймера adhEp1_frw. Выбор обратного праймера зависел от того, какую замену в сигнале –10-подобного элемента требовалось получить. Для получения матрицы дикого типа использовали олигонуклеотид adhEp1_short_rev, для матрицы с заменой в +11A→G, adhEp1+11G_rev. В качестве матрицы для ПЦР брали геномную ДНК *E. coli*.

Матрицы для транскрипции *in vitro*, содержащие промотор *ecnB* P и его вариант с заменой $+5A \rightarrow G$ получали с использованием прямого праймера ecnB_frw. Выбор обратного праймера зависел от того, какую замену в сигнале -10-подобного элемента требовалось получить. Для получения матрицы дикого типа использовали олигонуклеотид ecnB_short_rev, для матрицы с заменой в $+5A \rightarrow G$ брали ecnB $+5G_short_rev$. В качестве матрицы для ПЦР брали геномную ДНК *E. coli*.

Матрицы, содержащие промотор T5N25cons, получали с использованием прямого праймера T5N25Cons-left и обратного T5N25Univ-right. В качестве матрицы для ПЦР использовали олигонуклеотид T5N25Cons-7mer.

3.11. Получение рекомбинантных плазмид

Для клонирования в вектор плазмиду и вставку обрабатывали двумя рестриктазами, очищали путём электрофореза в агарозном геле, лигировали и трансформировали в клетки *E. coli* DH 5α. Из клеток выделяли плазмиду, как описано в пункте 3.6. Более подробный протокол получения плазмид представлен ниже. Последовательность вставки проверяли путём автоматического секвенирования в ЦКП «Геном».

3.11.1. Получение плазмиды PIA679 МХ гроВ с делецией кодонов 533-546

Фрагмент гена *гроВ* с делецией кодонов 533-546 был получен с использованием праймеров гроВ_Clal-for и EB-del533-546_3G_MfeI_r. Реакцию ПЦР проводили в объёме 20 мкл в следующих условиях: 1х буфер iProof HF (BioRad), 200 мМ dNTP (NEB), праймеры 0,5 мкМ, iProof-полимераза (BioRad) 5 ед. В качестве матрицы использовали 10 нг плазмиды pIA545. Режим амплификации: первичная денатурация 98 °C - 3 мин., денатурация 98 °C – 15 с, отжиг праймера 64 °C – 10 с, синтез 72 °C – 15 с, достройка 72 °C - 5 мин., количество циклов ПЦР - 25. Полученный фрагмент гена *гро*В очищали от праймеров путём электрофореза в 1,5%

агарозном геле, выделяли из геля. Далее данный фрагмент обрабатывали рестриктазами Clal Fd и MfeI Fd (Fermentas) в течение 1 часа. После этого проводили очистку ДНК-фрагмента путём электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим выделением из геля. Плазмиду pIA545 обрабатывали рестриктазами ClaI Fd и MfeI Fd (Fermentas) в течение одной ночи. Затем продукты рестрикции разделяли в 1,4% агарозном геле. Больший фрагмент плазмиды, соответствующий векторной части будущей конструкции, выделяли из геля и обрабатывали высокоактивной щелочной фосфатазой (Fermentas) для предотвращения его самолигирования. Для этого в объеме 20 мкл 3 мкг вектора в 1х буфере для щелочной фосфатазы (Fermentas) инкубировали в течение 15 мин при 37 °C. Далее фермент инактивировали путём нагревания при 75 °С в течение 5 мин. Для вставки ДНК-фрагмента, полученного методом ПЦР, в векторную часть плазмиды проводили лигирование. На одну реакцию лигирования брали 100 нг рестрицированного вектора pIA545, предварительно обработанного щелочной фосфатазой. ПЦР-фрагмент брали в молярном соотношении 1:3 к вектору (в пробу для контроля вместо вставки добавляли воду). Реакцию проводили в 1х лигазном буфере (Fermentas) и добавляли 500 ед. Т4 ДНК-лигазы (Сибэнзим). Смесь инкубировали в течении 45 мин. при температуре 16 °С. Затем проводили трансформацию компетентных клеток E. coli штамма DH 5а лигазной смесью. Проводили селекцию клеток по росту на среде с антибиотиком ампициллином, наличие делеции кодонов 533-546 проверяли секвенированием. Полученную плазмиду pIA545 гроВ Δ533-546 использовали в дальнейшем для переклонирования гена, кодирующего β-субъединицу с делецией остатков 533-546, в плазмиду pIA679. Для этого векторную плазмиду pIA679 рестрицировали по сайтам NcoI и SbfI и обрабатывали щелочной фосфатазой. Проводили вырезание целевого фрагмента гена гроВ из плазмиды pIA545 гроВ Δ 533-546 этими же рестриктазами, затем проводили лигирование фрагмента с целевой мутацией в вектор аналогично тому, как описано выше. Полученную плазмиду pIA 679MX гроВ Δ533-546 проверяли на наличие целевой вставки путем рестрикции с использованием ферментов XhoI Fd и MfeI Fd (Fermentas) и секвенирования.

3.11.2. Получение плазмид с мутациями в гене гроВ в векторе pBAD

Плазмиды с точечными мутациями и делециями в районе CRE-кармана под контролем арабинозного промотора были получены путём перестановки фрагмента гена *rpo*B из векторов pIA679_MX, содержащих требуемую мутацию, в плазмиду pBAD_rpoB. Для этого плазмиду pBAD_rpoB обработали рестриктазами ClaI Fd и MfeI Fd (Fermentas) в течение одной ночи. Проводили обработку щелочной фасфатазой, разделяли продукты путём электрофореза в 1,4% агарозном геле и выделяли требуемый фрагмент. Плазмиды pIA679_MX с мутациями обрабатывали рестриктазами аналогичным образом. После чего продукты рестрикции были

разделены в агарозном геле, из которого была вырезана полоса, соответствующая размеру 1694 п.н. После выделения из геля данный фрагмент был лигирован в плазмиду pBAD_rpoB, из которой предварительно была удалена часть гена *гро*В как было описано выше. Далее лигазной смесью трансформировали компетентные клетки и выделяли из них плазмиду. Наличие нужной вставки проверяли путём секвенирования.

3.11.3. Получение плазмиды pET29_rpoS_L117F

Фрагмент гена *rpoS* с точечной заменой L117F был получен с использованием праймеров ErpoS 38 NdeI d и sigmaS L117F rev. ПЦР проводили в объёме 20 мкл в следующих условиях: 1х буфер iProof HF (BioRad), 200 мМ dNTP (NEB), праймеры 0,5 мкМ, iProof-полимераза (BioRad) 5 ед. В качестве матрицы использовали 10 нг плазмиды pET29 rpoS. Режим амплификации: первичная денатурация 98 °C - 3 мин., денатурация 98 °C - 15 с, отжиг праймера 55 °C - 10 с, синтез 72 °C - 15 с, достройка 72 °C - 5 мин., количество циклов ПЦР - 25. Полученный продукт очищали от праймеров путём электрофореза в 2% агарозном геле, выделяли из геля. Далее данный фрагмент использовали в качестве мегапраймера для последующей ПЦР. Реакцию удлинения мегапраймера проводили в объёме 20 мкл в следующих условиях: 1x буфер iProof HF (BioRad), 200 мМ dNTP (NEB), праймер ErpoS 38 XhoI d 0,5 мкМ, мегапраймер 20 нг/мкл, iProof-полимераза (BioRad) 5 ед. В качестве матрицы использовали 10 нг плазмиды pET29 гроS. Режим удлинения: первичная денатурация 98 °С - 3 мин., денатурация 98 °C – 15 с, отжиг праймера 50 °C – 10 с, синтез 72 °C – 30 с, достройка 72 °C - 5 мин., количество циклов - 35. Полноразмерный продукт был отделён от не удлинённого мегапраймера путём электрофореза в 2% агарозном геле. Полоску, соответствующую ДНК нужного размера, вырезали и выделяли продукт из геля. Вставку обрабатывали рестриктазами Ndel и XhoI. Вектор рЕТ29 был обработан теми же эндонуклеазами рестрикции и щелочной фосфатазой по стандартному протоколу. Последующие стадии лигирования и трансформации компетентных клеток проводили как описано выше.

3.11.4. Получение плазмиды pET28_adhEp1_luxCDABE и её варианта с заменой в +11G

Промотор гена *adh*E получен методом ПЦР. В качестве прямого праймера брали олигонуклеотид adhEp1lux_frw. Выбор обратного праймера зависел от того, какой вариант промотора требовалось получить. Для получения промотора дикого типа брали олигонуклеотид adhEp1luxWT_rev, для варианта с заменой +11G использовали праймер adhEp1lux+11G_rev. ПЦР проводили в объёме 20 мкл в следующих условиях: 1х буфер iProof HF (BioRad), 200 мМ dNTP (NEB), праймеры 0,5 мкМ, iProof-полимераза (BioRad) 5 ед. В качестве матрицы использовали 10 нг геномной ДНК *E.coli*. Режим амплификации: первичная денатурация 98 °C -

3 мин., денатурация 98 °C – 15 с, отжиг праймера 60 °C – 10 с, синтез 72 °C – 15 с, достройка 72 °C - 5 мин., количество циклов ПЦР - 25. Полученный продукт очищали от праймеров путём электрофореза в 2% агарозном геле с последующим выделением из геля. Вставку обрабатывали рестриктазами EcoRI и ClaI. Вектор pET28_*rrnB* P1_*luxCDABE* был обработан теми же эндонуклеазами рестрикции и щелочной фосфатазой по стандартному протоколу. Последующие стадии лигирования и трансформации компетентных клеток проводили как описано выше.

3.12. Электрофорез белков в денатурирующем геле

Для анализа белков применяли систему денатурирующего ступенчатого электрофореза (Laemmli, 1970). В качестве концентрирующего геля использовали 4% ПААГ (соотношение акриламида и метиленбисакриламида 29:1; 0,125 М Трис-HCl, pH 6,8), разделяющий гель имел концентрацию от 8 до 12% (0,375 М Трис-HCl, pH 8,8). Оба геля содержали ДСН в концентрации 0,1%. Электродный буфер содержал 0,025 М Трис-HCl, pH 8,3, 0,192 М глицина и 0,1% ДСН. К исследуемым образцам добавляли равный объем буфера, содержащего 0,25 М Трис-HCl, pH 6,8, 10% глицерина, 2% ДСН, 2 мМ β-меркаптоэтанола и краситель бромфеноловый синий. Перед нанесением на гель пробы прогревали при 95 °C 5 мин. на термостате "Гном" (ДНК-технология) и центрифугировали 5 мин. при 14 тыс.об./мин. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В. Гели окрашивали красителем Кумасси G-250 (0,04% раствор в 4% хлорной кислоте) при нагревании в течение 15 минут, затем несколько раз отмывали не связавшийся краситель в горячей воде.

3.13. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли методом связывания белка с красителем Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad). Препарат белка растворяли в 800 мл воды и добавляли 200 мкл готового реагента, хорошо перемешивали и через 5 минут измеряли оптическую плотность раствора в пластиковой кювете при длине волны 595 нм на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences). В качестве стандарта использовали препарат σ-субъединицы РНКП *E. coli* с концентрацией белка 2,5 мг/мл или БСА (бычий сывороточный альбумин) с концентрацией 2 мг/мл.

3.14. Суперпродукция кор-фермента и σ³⁸-субъединицы РНКполимеразы *E. coli*

Ночную культуру клеток штамма BL-21(DE3), трансформированных соответствующими плазмидами, высевали в жидкую среду LB (объёмом 2 л для кор-фермента или 0,5 л для σ^{38} -субъединицы) с антибиотиком ампициллином (для кор-фермента) или канамицином (для σ^{38} -субъединицы) и выращивали при 37 °C и постоянном перемешивании до достижения

оптической плотности 0,7. После этого добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и растили клетки в течение еще 3 часов в таких же условиях. Для контроля индукции экспрессии генов РНКП отбирали аликвоты культуры клеток до добавления IPTG и по прошествии 3 часов с момента индукции. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге К-70 с охлаждением при температуре +4 °C в течение 30 минут, при 3500 об./мин., затем осадок замораживали при температуре -20 °C. Для анализа индукции 1 мл культуры центрифугировали 30 секунд при 14000 об./мин., осадок клеток суспендировали в буфере для нанесения (0,25 M Tpuc-HCl, pH 6,8, 10% глицерина, 2% ДСН, 2 мМ β-меркаптоэтанола и краситель бромфеноловый синий), прогревали в течение 5 минут при 98 °C, центрифугировали 10 мин. для осаждения фрагментов клеток при 14000 об./мин., полученный лизат использовали для проведения ступенчатого электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Об индукции свидетельствовало появление полосы на геле, соответствующей ожидаемой молекулярной массе белка.

3.15. Выделение кор-фермента РНКП Е. coli

Осадок клеток E. coli, полученный из 1 л культуры, тщательно ресуспендировали в 30 мл буфера для лизиса (см. ниже), оставляли на 30 минут в ледяной бане (все нижеописанные манипуляции также осуществляли на льду или при температуре +4°С). Затем проводили обработку ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 с. импульс, 9 с. пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400W). Лизат, обработанный ультразвуком, центрифугировали 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге К-24 с охлаждением, осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях, осадок снова отбрасывали. К супернатанту добавляли по каплям 5% раствор Polymin Р (полиэтиленимин) до конечной концентрации 0,35% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, после чего центрифугировали 12-15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге К-24 с охлаждением. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мл буфера TGED, содержащего 300 мМ NaCl, затем центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 12 мл буфера TGED, содержащего 1 M NaCl, повторяли процедуру центрифугирования, осадок отбрасывали, к супернатанту добавляли сульфат аммония из расчета 35 г на 100 мл, перемешивали при +4 °C в течение 40 минут и убирали в лёд на ночь. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге К-24 с охлаждением, осадок осторожно ресуспендировали в 12 мл буфера TGED, не содержащего NaCl. Полученный раствор центрифугировали 15 мин. при 10000 об./мин. для удаления нерастворившихся частиц. Затем супернатант разводили в 2 раза буфером TGED без NaCl и полученный препарат наносили на колонку с гепарин-сефарозой (Heparin-HiTrap, Pharmacia, объем колонки 5 мл), уравновешенную буфером В, со скоростью 1 мл/мин. При проведении хроматографии был использован прибор для FPLC фирм Pharmacia и

GE Healthcare. Колонку промывали 15 мл того же буфера, затем 15 мл буфера В, содержащего 450 мМ NaCl. РНКП элюировали буфером В, содержащим 600 мМ NaCl. К полученным растворам РНКП добавляли 1/6 объема буфера В без NaCl, данный раствор наносили на колонку с Ni-NTA агарозой (HiTrap Chelating Column, Pharmacia, объем колонки 5 мл), заряженную ионами Ni²⁺, нанесение проводили со скоростью 0,5 мл/мин. Колонку промывали 20 мл Ni-буфера без имидазола, затем 20 мл Ni-буфера, содержащего 20 мМ имидазола. РНКП элюировали Ni-буфером, содержащим 200 мМ имидазола. С появлением пика на самописце, регистрирующем концентрацию белка, выходящего с колонки, по поглощению в УФ-свете (280 нм), начинали собирать фракции по 1 мл. Белковый состав всех фракций анализировали при помощи электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Фракции, наиболее обогащенные РНКП, объединяли и диализовали в течение ночи при +4 °C против 1 л буфера для диализа. Пробы после диализа разбавляли в два раза буфером Е и наносили на колонку MonoQ 5/5 HR (объем 1 мл, Pharmacia), уравновешенную буфером Е, со скоростью 0,3 мл/мин. Колонку промывали 5 мл буфера E, PHKП элюировали градиентом от буфера E к буферу F со скоростью 0,3 мл/мин по следующей программе: 0-25% (13 мин.), 25-60% (63 мин.), 60-77% (45 мин), 77-83% (12 мин), 88-100% (13 мин), 100-100% (13 мин), 100-0% (2 мин), 0-0% (15 мин), и собирали фракции по 1 мл, используя коллектор фракций. Белковый состав фракций, соответствующих пикам кор- и холофермента, анализировали при помощи электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Белок концентрировали ультрафильтрацией на приспособлении Amicon Ultra 100K (Millipore) (до концентрации 2-5 мг/мл), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при температуре -20 °С.

Состав буферов, используемых при очистке белков:

<u>Лизирующий буфер (буфер А)</u>: 50 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 233 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 мМ β-меркаптоэтанол, лизоцим (0,2 мг/мл) и 0,1 мМ PMSF.

<u>Буфер TGED</u>: 10 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 5% глицерин.

<u>Буфер В:</u> 20 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 5% глицерин.

<u>Буфер С</u>: 20 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 600 мМ NaCl, 5% глицерин.

<u>Ni-буфер</u>: 10 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 500 мМ NaCl.

<u>Буфер для диализа:</u> 73 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 364 мМ NaCl, 1,8 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин.

<u>Буфер Е:</u> 40 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 5% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ.

<u>Буфер F:</u> 40 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 5% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 600 мМ NaCl.

Используемые для хроматографии растворы фильтровали через 0,4 мкм нейлоновые фильтры.

3.16. Выделение σ³⁸-субъединицы РНК-полимеразы *Е. coli*

Для выделения данного белка использована методика из работы Энтони и коллег (Anthony et al., 2003). Осадок клеток *E. coli*, полученный из 0,5 л культуры, тщательно ресуспендировали в 8 мл лизирующего буфера и клетки разрушали таким же способом, как и при выделении корфермента. Лизат центрифугировали 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24 с охлаждением. Супернатант отбрасывали, осадок повторно растворяли в лизирующем буфере и обрабатывали ультразвуком в аналогичных условиях. Препарат повторно центрифугировали. Осадок белого цвета (тела включения) растворяли в 10 мл денатурирующего буфера в течение 30 мин при постоянном перемешивании при температуре 4 °C. Далее раствор белка диализовали в течение ночи в 1 л ренатурирующего буфера. Смесь центрифугировали дважды по 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24 с охлаждением. Поученный супернатант наносили на колонку MonoQ 5/5 HR (объем 1 мл, Pharmacia). Хроматографию проводили аналогично кор-ферменту РНКП. Качество очистки анализировали при помощи электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Фракции, в которых не визуализировались посторонние белки, объединяли и концентрировали путём ультрафильтрации на Amicon Ultra 10K (Millipore), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при температуре -20°С.

Состав буферов, используемых при очистке σ^{38} -субъединиц:

<u>Денатурирующий буфер</u>: 50 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 100 мМ NaCl, 6 М гуанидин хлорид, 0,1 мМ ДТТ.

<u>Ренатурирующий буфер</u>: 40 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин.

3.17. Электрофорез РНК в денатурирующем геле

Для анализа РНК-продуктов в экспериментах по транскрипции *in vitro* проводили электрофорез в 1-х буфере ТВЕ (0,089 М Трис-борат, рН 7,9, 0,002 М ЭДТА) в денатурирующих ПААГ различного состава (в скобках указано соотношение акриламида к метиленбисакриламиду, в процентах указана их суммарная концентрация):

10% (29:1.5), 7 М мочевина;

15% (29:1.5), 7 М мочевина;

23% (20:3), 7 М мочевина;

30% (26:4), 5,3 М мочевина

После приготовления растворы для очистки от нерастворимых примесей фильтровали через 0,4 мкМ нейлоновые фильтры и хранили при комнатной температуре. Для запуска реакции полимеризации к раствору добавляли персульфат аммония (10 мкл на 1 мл раствора) и TEMED

(1 мкл на 1 мл раствора). Гель полимеризовали в течение 10-15 минут. Далее проводили электрофорез в камере VE-20 (Хеликон) с напряжённостью поля 40-50 В/см.

3.18. Транскрипция in vitro

3.18.1. Получение транскрипционных матриц

Матрицы для транскрипции *in vitro* получали двумя способами: методом ПЦР и путём очистки фрагмента нужной длины после обработки плазмиды рестриктазами в агарозном геле. Большинство матриц было получено методом ПЦР, как описано в разделе 3.10, с последующей очисткой электрофорезом и выделением из геля. Матрицу для определения скорости элонгации получали путём обработки плазмиды pGEMT 226-146 рестриктазами EcoRI Fd и HindIII Fd (Fermentas) с последующей очисткой электрофорезом и выделением из геля.

3.18.2. Тест на наличие транскрипционной активности

Выделенные препараты кор-фермента РНКП перед началом исследования были проверены на способность осуществлять все три стадии транскрипции. Для получения холофермента РНКП кор-фермент и σ^{70} -субъединицу смешивали в транскрипционном буфере ТВ 40 (40 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 40 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂) до концентрации 50 нМ и 250 нМ, соответственно, добавляли матрицу T7A1 tR2 (содержит промотор T7A1 бактериофага T7 и терминатор tR2 бактериофага λ) и инкубировали 7 минут при 37 °C. Далее к транскрипционным комплексам добавляли субстраты (100 мкМ NTP, 25 мкМ СрА, 2,5 мкКи α -[³²P]-UTP) и через 5 минут при 37 °C останавливали транскрипцию добавлением равного объема стоп-раствора (8 М мочевина, 20 мМ ЭДТА, 2хТВЕ). РНК-продукты анализировали в 10% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера Турhoon 9500 (GE Healthcare).

Качество очистки кор-фермента от σ -субъединицы проверяли путём транскрипции *in vitro*. Для этого в буфере ТВ 40 разводили препарат кор-фермента РНКП до концентрации 50 нМ. В контрольную точку (в качестве положительного контроля) добавляли σ^{70} -субъединицу до концентрации 250 нМ. Инкубировали 5 мин при 37 °C. Далее добавляли матрицу, содержащую промотор T5N25cons, до концентрации 25 нМ и собирали промоторный комплекс 5 мин при 37 °C. Ранее было показано, что данный промотор образует чрезвычайно прочные контакты с холоферментом РНКП, что позволяет выявить даже минимальное присутствие σ -субъединицы (Mekler et al., 2011). Далее добавляли ограниченный набор субстратов 25 мкМ СрА, 1 мкМ UTP и 2,5 мкКи α -[³²P]-UTP. Реакцию проводили в течение 10 мин, затем останавливали путём добавления равного объёма стоп-буфера. Продукты реакции делили на 23% ПААГ и визуализировали при помощи фосфоимиджера. Препарат кор-фермента проявлял активность в абортивном синтезе менее 0,1% по сравнению с положительным контролем.

2.18.3. Определение кинетики диссоциации промоторных комплексов в присутствии

гепарина

Для измерения кинетики диссоциации получали промоторный комплекс путём смешивания в буфере ТВ 40 50 нМ кор-фермента РНКП, 250 нМ о-субъединицы, и 25 нМ матрицы ДНК, содержащей промотор. Затем образцы инкубировали при температуре 37 °С в течение 10 минут. После этого отбирали «нулевую» точку (контроль без гепарина), к ней добавляли смесь нуклеотидных субстратов (свою для каждого промотора, см. таблицу ниже) и проводили реакцию абортивного синтеза в течение 1 минуты при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением равного объёма стоп-раствора (8 М мочевина, 20 мМ ЭДТА, 2xTBE). К оставшейся смеси добавляли гепарин до 100 мкг/мл, перемешивали и отбирали пробы из этой смеси через определенные интервалы времени с момента добавления гепарина. Каждую пробу инкубировали со смесью субстратов аналогично нулевой точке. Затем проводили электрофорез полученных проб в 23% денатурирующем ПААГ, РНК-продукты детектировали методом радиоавтографии при помощи фосфоимиджера. Количество радиоактивно меченого транскрипта на радиоавтографах в каждом опыте определяли в программе ImageQuant. Кинетику диссоциации промоторного комплекса аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка $A=A_0*exp(-k_{obs}*t)$, где A - количество транскрипта в данной временной точке, A_0 - количество транскрипта в нулевой точке, k_{obs} - константа скорости, t – время, в программе Grafit 5.0.6 (Eritacus software).

Название промотора	Добавляемые субстраты
T7A1	Затравка СрА 25 мкМ, 1 мкМ UTP, 2,5 мкКи α-[³²⁻ P]-UTP
T7A1+2G	Затравка СрА 25 мкМ, 1 мкМ GTP, 2,5 мкКи α-[³²⁻ P]-GTP
rrnB P1*	Затравка СрА 25 мкМ, 25 мкМ СТР, 1 мкМ UTP, 2,5 мкКи α-[³²⁻ P]-UTP
rrnB P1*+2G	Затравка СрА 25 мкМ, 25 мкМ GTP, 1 мкМ UTP, 2,5 мкКи α-[³²⁻ P]-UTP

3.18.4. Тест по определению скорости элонгации

Для получения холофермента РНКП кор-фермент и σ -субъединицу смешивали в транскрипционном буфере ТВ 40 до концентрации 50 нМ и 250 нМ, соответственно, добавляли матрицу для измерения скорости элонгации, содержащую фрагмент гена *rpo*B *E. coli* длиной около 500 нт. под контролем промотора λP_R (до 15 нМ), и инкубировали 5 минут при 37°С. Транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении от точки старта λP_R -промотора, получали, добавляя к промоторным комплексам ограниченный набор субстратов (20 мкМ затравки ApU, 10 мкМ ATP и GTP, 2,5 мкКи α -[³²P]-UTP), инкубировали 2 мин при 37 °С, а затем ещё 5 мин при температуре 20 °С. Далее к транскрипционным комплексам,

остановленным в +26 положении, добавляли смесь всех нуклеотидов до концентрации 200 мкМ и гепарин до конечной концентрации 15 мкг/мл (чтобы предотвратить повторную инициацию). Транскрипцию проводили при температуре +20 °C. Пробы отбирали из общей смеси через требуемые промежутки времени, реакцию останавливали добавлением равного объема стопраствора. РНК-продукты анализировали на 10% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера. Количество радиоактивно меченого полноразмерного продукта на радиоавтографах в каждом опыте определяли в программе ImageQuant. Графики зависимости количества полноразмерного продукта от времени реакции строили в программе Microsoft Excel. По этим графикам определяли время полусинтеза – время, за которое количество полноразмерного продукта достигает 50% от его максимального значения.

3.18.5. Определение продолжительности his-nays на матрицах с сигналом nays под контролем промотора

Для получения промоторного комплекса РНКП кор-фермент и о-субъединицу смешивали в транскрипционном буфере ТВ 40 до конечной концентрации 50 нм и 250 нМ, добавляли промоторный фрагмент ДНК (до конечной концентрации 15 нМ), содержащий в транскрибируемой области сигнал исследуемой паузы, и инкубировали 7 минут при 37 °С. Транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении от λP_R-промотора, получали, добавляя к промоторным комплексам ограниченный набор субстратов (25 мкМ затравки ApU, 10 мкМ АТР и GTP, 2,5 мкКи α-[³²P]-UTP). Транскрипцию проводили в течение 7 минут при температуре 37 °С. Отбирали «нулевую точку», после чего добавляли нуклеотиды АТР и UTP до концентрации 100 мкМ, СТР до 20 мкМ и GTP до 10 мкМ. Транскрипцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора (8 М мочевина, 20 мМ ЭДТА, 2хТВЕ) через различные промежутки времени. РНК-продукты анализировали на 15% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера. Количество радиоактивно меченого продукта, соответствующего транскрипционной паузе, на радиоавтографах в каждом опыте определяли в программе ImageQuant. При помощи программы Microsoft Exel находили относительное количество продукта в состоянии паузы в каждой временной точке. Полученные данные по кинетике транскрипционной паузы аппроксимировали в соответствии с уравнением кинетики первого порядка $A=A_0*exp(-k_{obs}*t)$, где A - относительное количество комплекса в состоянии паузы в данной временной точке, А₀ - расчётный параметр, отражающий количество комплекса в состоянии паузы во время, равное нулю, t - время, k_{obs} – наблюдаемая константа скорости выхода из паузы, в программе Grafit 5.0.6 (Eritacus software). Время полужизни паузы половина всех элонгационных комплексов РНКП (время, за которое покидает последовательность паузы) рассчитывали по формуле $t_{1/2} = \ln 2/k_{obs}$.
3.18.6. Определение продолжительности his-nays в синтетических ЭК

Введение радиоактивной метки на 5'-конец РНК-олигонуклеотида (ribo hisP 17) проводили в общем объёме смеси 10 мкл следующего состава: 10 мкМ РНК-олигонуклеотида, 1х-кратный буфер для Т4 полинуклеотидкиназы (New England BioLabs), 3 мкКи ү-[³²⁻P]-АТР и 5 единиц активности T4 полинуклеотидкиназы (New England BioLabs). Смесь инкубировали 30 мин при 37 °C. Далее фермент инактивировали путём прогревания при температуре 65 °C в течение 15 мин. 500 нМ меченой РНК смешивали с 600 нМ матричной цепи ДНК (t hisP WT) в 40 мкл буфера ТВ 40. Образец прогревали при 95 °С в течение 2 мин и далее медленно охлаждали до 25 °C со скоростью примерно 1 °C/мин. После отжига добавляли кор-фермент РНКП до концентрации 800 нМ. Смесь инкубировали 15 мин. при 37 °С. Далее добавляли нематричную цепь ДНК (nt hisP WT) до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали 15 мин. при 37 °C. Антисмысловую РНК (ribo antisense hisP) добавляли до 2 мкМ (в контрольную пробу добавляли буфер ТВ 40). Собранный комплекс разводили в 10 раз предварительно прогретым буфером ТВ 40, отбирали "нулевую точку" – точку без добавления NTP. Реакцию запускали путём добавления ограниченного набора нуклеотидных субстратов: GTP и CTP брали до 2 мкМ, UTP до 100 мкМ. Точки по 10 мкл отбирали через фиксированные интервалы времени и для остановки реакции смешивали с равными объёмами стоп-буфера. Для выявления комплексов, которые необратимо переходят в состояние паузы, к оставшейся реакционной смеси добавляли этот же набор NTP до конечной концентрации 500 мкМ каждого и инкубировали 5 мин. при 37 °C. РНК продукты разделяли в 19% ПААГ. Анализ паузы проводили как описано выше, но с вычитанием из значения относительного количества паузы, полученного для каждой точки, доли неактивного комплекса, определённого по конечной точке.

3.18.7. Определение эффективности терминации транскрипции на терминаторе tR2 бактериофага λ

Для определения эффективности терминации проводили сборку промоторного комплекса с промоторным фрагментом T7A1 tR2 (содержит промотор A1 бактериофага T7 и терминатор tR2 бактериофага λ). Транскрипционные комплексы, остановленные в +20 положении, получали добавлением к промоторным комплексам ограниченного набора субстратов (20 мкМ затравка ApU, 10 мкМ ATP, 10 мкМ CTP, 2,5 мкКи α -[³²P]-GTP). Транскрипцию проводили в течение 7 минут при температуре 37 °C. После этого в пробирку добавляли смесь всех 4-х нуклеотидов до концентрации 10 мкМ и гепарин до 15 мкг/мл. Транскрипцию проводили в течение 5 мин. при температуре 37 °C. Реакцию останавливали добавлением стоп-буфера. Продукты реакции делили в 10% ПААГ. Количество радиоактивно меченого продукта терминации и полноразмерного продукта на радиоавтографах определяли в

73

программе ImageQuant, затем в программе Microsoft Excel находили величину эффективности терминации, как отношение количества продукта терминации к сумме количеств полноразмерного продукта и продукта терминации.

3.18.8 Анализ б-зависимых пауз в синтетических ЭК

Комплексы ЭК Cons собирали с использованием РНК-олигонуклеотида RNA 20 pause. В качестве матричной и нематричных цепей ДНК для ЭК Cons выступали олигонуклеотиды t_60 и nt_60, соответственно. При исследовании влияния замен в сигнале паузы на транскрипцию использовали различные варианты олигонуклеотидов. Для сборки ЭК – TG в качестве матричной цепи были использованы олигонуклеотиды t60-TG и nt60-TG, соответственно. Для сборки ЭК -10М использовали олигонуклеотиды t60-10 М и nt60-10 М. Для работы с ЭК, сконструированном на основе промотора *adhE* P1, брали олигонуклеотиды RNA_adhEp1, adhEp1 t, adhEp1 nt в качестве PHK, матричной и нематричной цепей ДНК, соответственно.

Радиоактивная метка была введена на 5'-конец РНК-олигонуклеотида методом кинирования по стандартной методике (см. раздел 3.18.6). Далее 250 нМ меченой РНК смешивали с 2,5 мкМ матричной цепи ДНК в буфере ТК, содержащем 40 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 40 мМ КСІ. Образец прогревали при 65 °С в течение 3 мин и затем охлаждали до 20 °С со скоростью примерно 1 °С/мин. После отжига олигонуклеотидов препарат разводили в 3 раза буфером ТК и добавляли избыток кор-фермента РНКП до концентрации 190 нМ. Смесь инкубировали 15 мин. при 37 °C. Далее добавляли нематричную цепь ДНК до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали 15 мин. при 37 °С. Препарат делили на 2 части. К одной части прибавляли σ-субъединицу до конечной концентрации 2,5 мкМ и инкубировали 10 мин. при 37 °C, ко второй - аналогичное количество буфера для хранения белков (см. раздел 3.15). Далее собранный ЭК разбавляли предварительно прогретым до 37 °С буфером ТК в 10 раз, отбирали точку без нуклеотидов. Когда реакцию проводили в присутствии транскрипционных факторов GreA или GreB, их вносили перед добавлением НТФ до концентрации 1 мкМ. Реакцию запускали добавлением смеси всех NTP и MgCl₂ до конечной концентрации 100 мкМ и 10 мМ, соответственно (в случае ЭК Cons и его вариантов), либо АТР, GTP, CTP до 200 мкМ, UTP до 20 мкМ, 10 мМ MgCl₂ (в случае ЭК *adhE*).

Точки по 10 мкл отбирали через фиксированные интервалы времени и для остановки реакции смешивали с равными объёмами стоп-буфера. РНК разной длины разделяли в 15% ПААГ, детекцию меченых продуктов проводили при помощи фосфоимиджера.

3.18.9 Измерение аффинности осубъединиц к ЭК с по эффективности образования

паузы

ЭК собирали и разводили до концентрации 10 нМ как описано выше. Далее к комплексам добавляли σ -субъединицу в концентрации от 50 нМ до 10 мкМ. Смесь инкубировали 10 мин. при 37 °C. Добавляли весь набор НТФ до конечных концентраций как в пункте 3.18.8, инкубировали смесь в течение 1 мин. при 37 °C. Электрофорез и визуализацию продуктов проводили, как описано выше. Количество радиоактивно меченых продуктов, соответствующих транскрипционной паузе и полноразмерному продукту, на радиоавтографах определяли для каждой концентрации σ -субъединицы в программе ImageQuant. Находили относительное количество продуктов в состоянии паузы от суммы полноразмерного продукта и продукта в состоянии паузы. Эти значения аппроксимировали в программе Grafit 5.0.6 уравнением P=P_{max}*C/(C+Kd) + А, где P - эффективность паузы при соответствующей концентрации σ -субъединицы, С - концентрация σ -субъединицы, А - фоновая пауза, которая происходит и без добавления σ -субъединицы.

3.18.10 Исследование σ^{38} -зависимых пауз на природных промоторах

Для анализа σ^{38} -зависимых пауз на природных промоторах и их вариантах с заменой в -10-подобном элементе в буфере ТВ 40 собирали холофермент из кор-фермента РНКП и σ^{38} субъединицы, взятых в концентрации 50 нМ и 250 нМ, соответственно, в течение 3 мин. при 37 °C. К собранному холоферменту добавляли промоторную ДНК до концентрации 25 нМ и инкубировали 10 мин. при 37 °C. Нуклеотидные субстраты добавляли в зависимости от исследуемого промотора. Для промотора *adhE* Р1 и его вариантов добавляли в зависимости от конечной концентрации 200 мкМ, UTP до 20 мкМ, гепарин до 10 мкг/мл (для предотвращения неспецифической инициации). В опытах с $\sigma^{38}\Delta 3.2$ вместе с NTP добавляли затравку АрА до конечной концентрации 25 мкМ (контрольный эксперимент с σ^{38} дикого типа проводили тоже с затравкой). Для промотора *есп*В добавляли следующие субстраты: GTP и CTP до 100 мкМ, ATP и UTP до 2 мкМ. Если требовалось, в реакцию добавляли GreB до конечной концентрации 1 мкМ. Реакцию останавливали добавлением равного объёма стоп-раствора, продукты разделяли в 15% ПААГ и визуализировали стандартным образом.

3.19. Измерение аффинности σ-субъединиц к ЭК методом задержки в

геле

ЭК собирали и разводили до концентрации 10 мкМ как описано выше. Для предотвращения неспецифической агрегации к смеси добавляли БСА до конечной концентрации 1 мг/л. Далее к

комплексам добавляли σ-субъединицу в концентрации от 50 нМ до 10 мкМ. Смесь инкубировали 10 мин. при 37 °С. По окончании этого времени в образец добавляли 5-кратный буфер для нанесения на гель следующего состава: ТВЕ 5х, глицерин 50%, бромфеноловый синий. Для разделения ЭК, содержащих σ-субъединицу, от свободных ЭК использовали электрофорез в 5% (37,5:1) нативном ПААГ. В качестве буфера для электрофореза использовали 0,5х ТВЕ. Разделение проводили при напряжённости поля 10 В/см при комнатной температуре.

3.20. Исследование параметров расплавленного участка комплекса в состоянии паузы методом перманганатного футпринтинга

Промотор *adhE* P1, содержащий радиоактивную метку в матричной цепи, был наработан путём ПЦР с предварительно кинированным праймером adhEp1 rev. Полученный ПЦР-продукт был очищен путём электрофореза в 5% нативном ПААГ. Продукт ожидаемого размера визуализировали с помощью радиоавтографии и вырезали из геля. Полоску акриламидного геля измельчали, добавляли 500 мкл буфера для элюции (300 мМ ацетат натрия, pH 5,8, 1 мМ ЭДТА) и элюировали в течение 2-3 часов при комнатной температуре при мягком покачивании. Буфер отбирали в чистую пробирку Eppendorf, центрифугировали при 14000 об./мин в течение 3 мин. Супернатант отбирали в чистую пробирку, добавляли 3 объёма 96% этанола, образец замораживали в жидком азоте. Затем пробу центрифугировали при 14000 об./мин в течение 15 мин. при температуре 4 °C. Осадок дважды промывали 70% этанолом, подсушивали и разводили в буфере ТЕ. Для получения холофермента РНКП 100 нМ кор-фермента смешивали с 500 нМ σ³⁸-субъединицы и инкубировали 3 мин. при 37 °C. Затем к собранному комплексу добавляли примерно 10 нМ меченого промотора adhE P1. Смесь инкубировали 15 мин при 37 °С. Обработку перманганатом калия проводили путём добавления водного раствора КМпО₄ до концентрации 2 мМ в течение 30 с при 37 °C. Реакцию останавливали путём добавления равного объёма буфера, содержащего 1 M β-меркаптоэтанол и 1 M ацетат натрия, pH 4,8. После этого пробы переосаждали этанолом, высушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл 10% пиперидина. Пробы прогревали в твёрдотельном термостате при температуре 95 °С в течение 15 мин. Затем образец охлаждали до комнатной температуры, добавляли 100 мкл безводного хлороформа, тщательно перемешивали жидкости в течение 30 с. Затем пробы центрифугировали при 14000 об./мин при комнатной температуре в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу отбирали и переосаждали этанолом. Пробы растворяли в воде и добавляли равный объём стоп-буфера с мочевиной. Пробы разделяли путём электрофореза в 17% ПААГ (получали путём смешения 15% и 23% гелей). Для идентификации позиции модификации тиминов использовали маркёр, который представлял собой тот же самый ПЦР продукт,

который был расщеплён методом Максама-Гилберта по пуриновым основаниям. Для этого ПЦР продукт обрабатывали 3% муравьиной кислотой в течение 15 мин. при 37 °C. ДНК переосаждали этанолом, осадок промывали и высушивали. Дальнейшую обработку пиперидином и очистку хлороформом проводили как описано выше.

3.21. Эксперименты *in vivo*

3.21.1 Определение выживаемости клеток, экспрессирующих β-субъединицу с мутациями в CRE-кармане

Для анализа эффектов мутаций в районе CRE-кармана β -субъединицы на фенотип бактериальных клеток термочувствительный штамм *E. coli* RL585 был трансформирован вектором pBAD со вставкой гена *rpoB* с соответствующей мутацией (в качестве отрицательного контроля брали пустой вектор pBAD). Клетки высевали на твёрдую среду LB с 2% глюкозой. Единичную колонию сеяли в 3 мл среды LB с 2% глюкозой, растили при 30 °C 14 часов. После этого измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм (OD₆₀₀). Культуру клеток разводили до OD₆₀₀ 0,4. После последовательных 10-кратных разведений в стерильном серологическом планшете высевали по 2 мкл суспензии клеток на твёрдую питательную среду, содержащую 0,2% арабинозу с добавлением ампицилина. Клетки растили при 30 °C и при 42 °C в течение 2-3 дней.

3.21.2 Определение влияния мутаций в районе CRE-кармана β-субъединицы на чувствительность к антибиотику рифампицину

Штамм *E. coli* DH 5α был трансформирован вектором pBAD со вставкой гена *rpoB* с соответствующей мутацией (в качестве отрицательного контроля брали пустой вектор pBAD). Единичную колонию сеяли в 5 мл среды LB, растили при 37 °C 14 часов. Культуру клеток разводили до OD₆₀₀ 0,4, и высевали на твёрдую LB с 0,2% арабинозой, ампицилином и рифампицином, который брали в концентрациях 0, 20 и 50 мкг/мл. Чашки растили 2 дня при 37 °C.

3.21.3 Определение влияния замены +11G в сигнале σ³⁸-зависимой паузы промотора adhE P1 на эффективность экспрессии репортерного гена

Для измерения активности экспрессии люциферазы под контролем промотора *adhE* P1 и ассоциированных с ним регуляторных областей клетки *E. coli* K-12 MG1655 были трансформированы плазмидами pET28_*adhE* P1_luxCDABE и pET28_*adhE* P1+11G_luxCDABE. Клетки высевали на среду LB с канамицином. После этого единичную колонию сеяли в среду LB с канамицином и растили при 37 °C ночь. Культуру уравнивали по OD₆₀₀ (до 0,5) и сеяли в среду LB с MOPS и канамицином из расчёта 10 мкл культуры на 2 мл среды. Клетки растили в предварительно проавтаклавированных пробирках Eppendorf объёмом 2 мл, заполненных доверху средой и обёрнутых плёнкой Parafilm. Paнее было показано, что такие условия

являются анаэробными и благоприятны для экспрессии данного гена (Aristarkhov et al., 1996; Membrillo-Hernandez and Lin, 1999; Mikulskis et al., 1997). Через фиксированный интервал времени пробирку открывали, измеряли OD_{600} . 0,5 мл культуры переливали в 1,5 мл пробирку Ерреndor, в крышке которой делали отверстие диаметром 3 мм. Пробирки ставили на качалку и аэрировали путём аккуратного перемешивания в течение 5 мин при комнатной температуре. Интенсивность люминесценции измеряли на люминометре Modulus II Microplate Multimode Reader (Turner BioSystems), время накопления сигнала 1,5 с. Полученную интенсивность каждой пробы нормировали на OD_{600} каждого образца.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Роль контактов CRE-кармана с ДНК в транскрипции и

формировании пауз

Для осуществления инициации транскрипции в определенных участках РНКП должна узнавать последовательность промотора при помощи специфических взаимодействий с ДНК. Но, в то же время, для эффективной и "гладкой" элонгации фермент должен взаимодействовать с ДНК-матрицей с низкой специфичностью к транскрибируемой последовательности. У бактерий данная проблема решается элегантным способом. Для узнавания промотора привлекается σ-субъединица, которая образует специфические контакты с последовательностью промотора, участвуя в узнавании и плавлении ДНК около точки старта. Большим удивлением стало открытие, что при образовании промоторного комплекса специфические контакты с расплавленной областью ДНК образует не только σ-субъединица, но и кор-фермент РНКП (Zhang et al., 2012). Такие взаимодействия происходят между нематричной цепью ДНК в районе старта транскрипции и так называемым CRE-районом РНКП. В частности, в CRE-кармане специфически размещается гуанин в +2 положении нематричной цепи промотора (раздел 2.3.2). CRE-карман образуют две петли β-субъединицы: верхнюю часть формируют аминокислотные остатки с 440 по 450 позицию, а нижнюю - с 535 по 555, последний сегмент также называется fork-loop2 (рисунок 4.1). Рядом с CRE-карманом находится остаток W183 β-субъединицы, который формирует стэкинг-взаимодействие с +1 основанием нематричной цепи промотора (Zhang et al., 2012). В нашей работе мы заинтересовались ролью этих взаимодействий в транскрипции. Мы предположили, что CREкарман может участвовать в узнавании определенных типов сигналов пауз и/или терминации транскрипции. Первая часть нашего исследования посвящена изучению роли CRE-кармана и его взаимодействий с ДНК на разных стадиях транскрипции. С этой целью были получены следующие мутации в РНКП: W183A, D446A, E546A, Δ443-451, Δ533-546. Все мутантные варианты РНКП были экспрессированы и получены в очищенном состоянии (см. материалы и методы) и исследованы в экспериментах по транскрипции in vitro.



Рисунок 4.1. Взаимодействия СRE-кармана с нематричной цепью ДНК в промоторном комплексе РНКП *Thermus thermophilus* (Basu et al., 2014). (А) Общий вид промоторного комплекса. (Б) Взаимодействия РНКП с ДНК на переднем конце транскрипционного пузыря. Ионы магния в активном центре показаны пурпурными сферами. Два инициаторных нуклеотида показаны жёлтым и оранжевым цветом. Матричная цепь ДНК показана чёрным цветом, нематричная – синим. Гуанин в +2 положении (показан красным цветом), образует специфические контакты с остатками CRE-кармана. Рядом расположен остаток W183 (показан бирюзовым цветом), который взаимодействует с +1 основанием нематричной цепи (показан синим цветом).

4.1.1 Исследование роли остатка гуанина в +2 положении промотора в

стабилизации промоторного комплекса

Структурные исследования промоторного комплекса показали, что СRE-карман РНКП способен связывать остаток G в +2 положении промотора (Basu et al., 2014; Zhang et al., 2012). Однако, использованные модельные системы содержали неполную матрицу ДНК, а также были проведены на РНКП филогенетически далёких от *E. coli* бактерий рода *Thermus*. В своей работе мы решили биохимически подтвердить существование таких контактов РНКП *E. coli* с полноценной промоторной ДНК. Для этого был выбран классический метод измерения стабильности промоторных комплексов в присутствии конкурентного аналога ДНК гепарина (отрицательно заряженный полисахарид). К сформированному промоторному комплексу добавляют избыток гепарина, который связывает свободную РНКП и не даёт ей взаимодействовать с ДНК. Затем при помощи реакции синтеза абортивных продуктов в присутствии меченых субстратов детектируют относительное количество активного комплекса через определённые промежутки времени (за 100% принимают активность в контрольной точке без добавления гепарина). Такой метод показывает, насколько хорошо ДНК связана с РНКП в

промоторном комплексе. Чем больше контактов и чем они крепче, тем медленнее диссоциирует комплекс. Для того чтобы выявить существование контактов остатка +2G в промоторном комплексе, мы ввели в последовательность хорошо изученного промотора T7A1 остаток гуанина в +2 положение (T7A1+2G, рисунок 4.2).



Рисунок 4.2. Схема промоторов, использованных в исследовании влияния остатка гуанина в +2 положении на инициацию транскрипции. В работе использовали промотор T7A1 дикого типа, его вариант с заменой +2G (показана жёлтым цветом), промотор *rrnB* P1-7G (в тексте обозначен *rrnB* P1*, замена -7G показана зелёным цветом) и его вариант с заменой +2G (отмечена жёлтым). На схеме показаны основные элементы промотора -35 (голубой цвет), -10 (розовый). Точка старта отмечена серым цветом и обозначена +1.

Затем измерили скорость диссоциации промоторных комплексов, образованных РНКП дикого типа (WT) на промоторах T7A1 дикого типа (T7A1) и его варианте T7A1+2G (рисунок 4.3 A). Мы установили, что замена $+2T \rightarrow G$ в промоторе T7A1 приводит к значительной стабилизации промоторного комплекса: $t_{1/2}$ возрастает с 257 с до 662 с (рисунок 4.3 Б и таблица 4.1). Для того, чтобы понять, является ли такой эффект замены нуклеотида в +2 положении промотор специфическим, мы протестировали второй хорошо изученный промотор *rrnB* P1*, который является довольно нетипичным промотором. Комплексы РНКП с этим промотором обладают очень маленькой стабильностью, из-за длинного размера участка между -10 элементом и точкой старта и неоптимальной последовательности дискриминатора. Использованный вариант промотора *rrnB* P1* имеет замену -7G и образует более стабильный комплекс с РНКП, чем природный промотор, что даёт возможность для количественного измерения времени полужизни комплекса в присутствии гепарина (Haugen et al, 2008). Оказалось, что промотор *rrnB* P1*+2G образует более стабильные комплексы, чем промотор *rrnB* P1*, содержащий в +2 положении остаток C ($t_{1/2}$ 25 с и 14 с, соответственно, таблица 4.1). Таким образом, данный эффект проявляется на разных типах промоторов. Это позволяет предположить, что введённый нами остаток +2G связывается в CRE-кармане, как это было показано на структурах промоторного комплекса (Basu et al., 2014; Zhang et al., 2012).



Рисунок 4.3. Измерение стабильности промоторного комплекса на промоторе T7A1 и его варианте T7A1+2G. (А) Схема эксперимента. Холофермент РНКП инкубировали с ДНК для сборки промоторного комплекса. Далее к смеси добавляли гепарин и измеряли транскрипционную активность через определённые промежутки времени. (Б) Кинетика диссоциации промоторных комплексов РНКП дикого типа и мутанта D446A на промоторах T7A1 дикого типа (WT) и T7A1+2G (+2G). За 100% принималась активность в контрольной точке без добавления гепарина.

Для проверки этой гипотезы мы протестировали влияние точечных замен и делеций в CREкармане на стабильность RPo на промоторе T7A1 (таблица 1). Можно видеть, что замена E546A не привела к снижению стабильности промоторного комплекса на промоторе дикого типа ($t_{1/2}$ 245 с). Мутация D446A уменьшила стабильность RPo ($t_{1/2}$ 104 с). Обе делеции настолько сильно дестабилизировали промоторный комплекс, что $t_{1/2}$ комплекса не удалось измерить.

Таким образом, снижение стабильности промоторных комплексов указывает на то, что остатки исследуемого района играют роль в связывании промоторной ДНК, вероятно, за счёт контактов с нематричной цепью ДНК, как это видно на структуре РНКП. Особенно интересным оказалось поведение РНКП с заменой D446A на промоторе T7A1+2G. В случае этого мутанта, в отличие от РНКП дикого типа, замена +2G не приводит к стабилизации комплекса на данном промоторе ($t_{1/2}$ 107 с, что в пределах ошибки с аналогичными измерениями для данного мутанта на промоторе дикого типа). Замена E546A ведёт себя схожим образом, но в этом случае наблюдается небольшая стабилизация комплекса ($t_{1/2}$ 245 с, в случае промотора T7A1, $t_{1/2}$ 356 с в случае промотора T7A1+2G). Рядом с CRE-карманом находится остаток W183, который

образует стэкинг-взаимодействие с азотистым основанием +1 нуклеотида нематричной цепи и также относится к CRE-району (рисунок 4.1 Б).

РНКП	Промотор	t _{1/2} (c)	Относительное значение
WT	T7A1	257 ± 5	1
	T7A1+2G	662 ± 45	2,6
D446A	T7A1	104 ± 9	0,40
	T7A1+2G	107 ± 15	0,42
E546A	T7A1	245 ± 30	0,96
	T7A1+2G	356 ± 13	1,4
W183A	T7A1	49 ± 10	0,19
	T7A1+2G	94 ± 22	0,37
Δ443-451	T7A1	<10	< 0,04
Δ533-546	T7A1	<10	< 0,04
WT	rrnB P1*	14 ± 3	1
	rrnB P1*+2G	25 ± 1	1,8

Таблица 4.1. Время полужизни (t_{1/2}, c) промоторных комплексов РНКП дикого типа и РНКП, содержащих мутации в районе CRE, на промоторах T7A1 и *rrnB* P1* и их вариантах с заменой в +2 положении.

Для того, чтобы оценить роль такого взаимодействия, мы измерили стабильность промоторного комплекса для РНКП с заменой W183A. Оказалось, что данная замена приводит к сильной дестабилизации промоторного комплекса, что указывает на то, что данный остаток контактирует с ДНК и играет роль в формировании промоторного комплекса. Однако, замена +2G приводит к увеличению стабильности промоторного комплекса, образованного РНКП с этой мутацией, соответственно, остаток W183 не участвует в узнавании +2G. Таким образом, наши биохимические данные полностью согласуются с опубликованными ранее структурными данными, что позволяет считать, что существуют специфические взаимодействия остатков нематричной цепи ДНК с CRE-регионом. При этом остаток +2G специфически взаимодействует с CRE-карманом, что может вносить вклад в стабильность промоторного комплекса.

4.1.2 Исследование влияния замен в СПЕ-районе на скорость элонгации

транскрипции

Установив, что замены в СRE-районе влияют на стадию инициации, мы решили посмотреть, каким образом остатки этого района могут быть вовлечены в другие стадии транскрипции. На следующем этапе нашего исследования мы измерили скорость элонгации РНКП дикого типа и полимераз, содержащих мутации в CRE-регионе. Для этого мы использовали матрицу, которая содержит под контролем промотора λP_R фрагмент гена *rpoB E. coli* размером около 500 п.н., который не содержит классических сигналов пауз и терминаторов (Ederth et al., 2002). В последовательности первых 26 нуклеотидов от точки старта промотора не содержится остатков цитозина, что позволяет путём добавления ограниченного набора нуклеотидов (без СТР) получить остановленный в +26 положении комплекс, и таким образом синхронизировать систему. Это позволяет исследовать влияние мутаций на элонгацию транскрипции, а не на инициацию. К остановленным комплексам добавляли полный набор нуклеотидов вместе с гепарином (чтобы предотвратить повторную инициацию) и отбирали точки через фиксированные промежутки времени (рисунок 4.4 А).



Рисунок 4.4. Сравнение скоростей элонгации РНКП дикого типа и РНКП с мутациями в СRE-районе. (А) Схема эксперимента. Вначале собирают промоторный комплекс, затем добавляют ограниченный набор нуклеотидов, содержащий радиоактивно меченый UTP, в результате чего образуется меченый продукт размером в 26 нуклеотидов. Далее добавляют полный набор нуклеотидов и отбирают точки через фиксированные промежутки времени, реакцию останавливают, продукты разделяют в 10% ПААГ (рисунок 4.3). (Б) Кинетика накопления полноразмерного продукта транскрипции (RO). За 100% принимается количество полноразмерного продукта в последней точке.

Продукты разделяли путём электрофореза в ПААГ и находили относительное количество полноразмерного продукта (за 100% принимали количество полноразмерного продукта в последней временной точке). В результате можно видеть, что РНКП дикого типа (рисунок 4.5, средняя панель) формирует множество остановок по ходу транскрипции, однако довольно быстро доходит до конца матрицы. Исследуемые мутации по-разному влияют на скорость элонгации (рисунки 4.4 Б и 4.5). РНКП с заменами D446A и W183A имеют такую же среднюю скорость, что и РНКП дикого типа. Замена E546A приводит к увеличению скорости элонгации, т.к. подавляет формирование промежуточных пауз, вероятно, за счёт потери контактов с нематричной цепью ДНК.



Рисунок 4.5 Измерение скорости элонгации РНКП дикого типа и РНКП, содержащих мутации в СRE-кармане, на матрице с фрагментом гена *гроВ Е. соli* под контролем промотора $\lambda P_{\rm R}$. РНК-продукты разделяли с помощью электрофореза в 10% ПААГ. На рисунке отмечен полноразмерный продукт (RO). Можно видеть, что во время прохождения матрицы РНКП узнаёт сигналы пауз. Стрелками обозначены паузы, которые усиливаются (\uparrow) и ослабляются (\downarrow) мутацией D446A, в сравнении с РНКП дикого типа (WT).

Две делеции замедляют скорость элонгации, за счёт усиления пауз, которые образует полимераза дикого типа, а также появления новых пауз (в случае $\Delta 533-546$). Такое поведение данных мутантов можно объяснить следующим образом. При формировании паузы РНКП теряет часть контактов остатков главного канала с ДНК (раздел 2.5.2). Для того чтобы выйти из состояния паузы, РНКП нужно сформировать их заново. Как можно видеть из структуры промоторного комплекса (рисунок 4.1), белковые петли района fork формируют также неспецифические контакты с нематричной цепью ДНК, причём в первую очередь именно нижняя петля, которая соответствует делеции $\Delta 533-546$, эффект которой на скорость элонгации гораздо сильнее. Потеря этих контактов в случае мутантных РНКП может замедлять выход из состояния паузы. Интересно, что, хотя мутация D446A не приводит к значительному изменению средней скорости элонгации, она по-разному влияет на промежуточные паузы. Это

позволяет предполагать, что взаимодействие CRE-кармана с нематричной цепью может поразному влиять на узнавание разных сигналов пауз. Также можно сказать, что все исследованные мутации слабо влияют на скорость элонгации по сравнению с мутациями в области активного центра (Miropolskaya et al., 2009; Miropolskaya et al., 2014; Vassylyev et al., 2007b), т.к. исследуемый район не вовлечён в процесс включения нуклеотидов напрямую, а наблюдаемые эффекты, вероятно, объясняются различной способностью данных мутантных полимераз узнавать сигналы пауз.

4.1.3 Исследование роли СRE-кармана при формировании шпилько-зависимых пауз

Проведённый нами тест по измерению скорости элонгации показал, что мутации в CREкармане умеренно влияют на скорость элонгации, в частности, за счёт изменения продолжительности пауз. Однако природа и позиции пауз на использованной матрице точно не известны, что затрудняет интерпретацию данных. Поэтому дальнейшее исследование мы проводили на модельных системах, которые содержат сигналы охарактеризованных ранее пауз транскрипции. В качестве первой модели мы выбрали наиболее хорошо изученную шпилькозависимую паузу в гистидиновом опероне энтеробактерий, так называемую his-nayзу (hisP, Artsimovich and Landick 2000). Данная пауза имеет довольно сложно устроенный сигнал 4.6 (рисунок A), который включает последовательность РНК/ДНК-гибрида И последовательность, которая при транскрипции формирует РНК-шпильку. Мы обратили внимание, что в +1 положении сигнала паузы находится остаток гуанина (+1G), который соответствует гуанину в +2 положении промоторного комплекса (так как положение 3'-конца РНК в ЭК обозначают как -1, а следующий нуклеотид +1, а в промоторном комплексе первый нуклеотид обозначают +1, а следующий за ним +2). На рисунке 4.6 А видно, что сигнал этой паузы в области РНК/ДНК-гибрида напоминает сигнал консенсусной паузы, который также содержит G в +1 положении (Vvedenskaya et al., 2014, Larson et al., 2014). На основании этих рассуждений мы предположили, что CRE-карман может принимать участие в узнавании этого остатка в сигнале *his*-паузы. Чтобы проверить эту гипотезу, мы получили замену +1С в сигнале паузы (*his*P+1C). Выбор замены G на C обусловлен тем, что +1 положение ЭК как раз находится на границе расплавленного участка ДНК, а только GC-пара образует три водородные связи между азотистыми основаниями. Такая замена в сигнале паузы не будет создавать условия для преждевременного выхода из состояния паузы за счёт введения более легкоплавкой пары в ДНК-гибрид, но позволит оценить вклад остатка +1G в формирование сигнала паузы.



Рисунок 4.6. Анализ влияния остатка +1G в сигнале *his*-паузы на формирование пауз РНКП дикого типа (WT) и РНКП, содержащей замену D446A. (А) Схема сигнала паузы. (Б) Схема эксперимента. Вначале собирали промоторный комплекс на исследуемой матрице. Далее добавляли ограниченный набор нуклеотидов, в результате чего формировался ЭК, содержащий меченый транскрипт длиной в 26 нуклеотидов. Благодаря этому достигалась синхронизация транскрипции. Путём добавления полного набора нуклеотидов запускали реакцию, через фиксированное время отбирали точки и добавляли стоп-раствор. Продукты анализировали с помощью электрофореза в 15% ПААГ. (В) Кинетика выхода из *his*-паузы для РНКП дикого типа и мутанта D446A на матрице, содержащей сигнал *his*-паузы дикого типа (*his*P WT) и с заменой +1C (*his*P+1C). На графике показана зависимость относительного количества комплексов в состоянии паузы от времени. Отмечена величина максимальной эффективности образования паузы (max).

Как оказалось, пауза с такой заменой примерно в 5,5 раз короче паузы на сигнале дикого типа (t_{1/2} 64 с и t_{1/2} 11,7 с для *his*P WT и *his*P+1C, соответственно, рисунок 4.6 В, таблица 4.2). Это хорошо согласуется с предыдущими исследованиями, которые показали, что последовательность спереди по направлению транскрипции важна для формирования *his*-паузы (Lee and Landick 1990, Chan and Landick 1993, Chan and Landick 1997). С учётом положения гуанина в сигнале паузы логично предположить, что он узнаётся CRE-карманом РНКП, поэтому наше дальнейшее исследование было посвящено изучению влияния мутаций в CREкармане РНКП на продолжительность *his*-паузы. Оказалось, что точечные замены D446A и Е546А снижают продолжительность паузы примерно в 2,6 раза (рисунок 4.6 В, таблица 4.2).

Таблица 4.2. Измерение продолжительности *his*-паузы (t_{1/2}, c) для РНКП дикого типа и РНКП с точечными мутациями в CRE-кармане в зависимости от замен в сигнале паузы.

РНКП	hisP WT	hisP +1C
WT	$64,0 \pm 6,4$	$11,7 \pm 1,9$
D446A	$24,8 \pm 1,7$	$13,9 \pm 2,1$
E546A	$24,5 \pm 3,1$	$8,2 \pm 1,1$
W183A	$69,5 \pm 10,6$	-

Этот факт указывает на то, что остатки CRE-кармана вовлечены в формирование паузы. Чтобы показать, что CRE-карман узнаёт именно остаток G в +1 положении паузы, мы измерили продолжительность паузы с этими мутантными полимеразами на матрице hisP+1C. Оказалось, что мутации практически не приводят к дальнейшему уменьшению продолжительности данной паузы (таблица 4.2). Если сравнивать $t_{1/2}$ на hisP+WT и hisP+1C в случае мутантных полимераз, то можно видеть, что эффект замены в сигнале паузы становится уже не столь сильным, как в случае РНКП дикого типа. Индивидуальные аминокислотные замены не приводят к полной неспособности узнавать замену G на C в +1 положении, т.к. остаются другие остатки в CRE-кармане, которые могут частично выполнить узнавание. Эти данные ясно свидетельствуют в пользу того, что остатки CRE-кармана вовлечены в распознавание остатка гуанина в +1 положении сигнала паузы.

Мы показали, что мутация D446A приводит к уменьшению продолжительности hisпаузы. Это противоположно влиянию этой мутации на последовательности на консенсусные паузы in vitro и in vivo (Vvedenskaya et al., 2014). В то же время, анализ данных NET-seq показывает, что замена D446A усиливает консенсусные паузы, но подавляет hisP in vivo (P. Лэндик, личное сообщение на основе анализа базы данных, полученной в paботе Vvedenskaya et al., 2014). Таким образом, можно сделать вывод, что влияние замены D446A на hisP отличается от эффекта на подавляющее большинство пауз в системах in vitro и in vivo. Существенным отличием hisP от консенсусной паузы является то, что во время hisP образуется PHK-шпилька, которая находится в РНК-выводящем канале ЭК. Наличие шпильки способствует конформационным преобразованиям, которые приводят к открытию домена clamp, и препятствуют транслокации и сворачиванию TL в активном центре, что приводит к усилению паузы (Hein et al., 2014; Nayak et al., 2013). Для того, чтобы прояснить возможную роль РНКшпильки в узнавании сигнала hisP в зависимости от мутаций в CRE-кармане, мы решили "разобрать" сигнал his-паузы. Для этого мы собирали из олигонуклеотидов и РНКП синтетический ЭК, последовательность которого соответствует сигналу hisP (рисунок 4.7). Такая система содержит последовательность сигнала в области РНК/ДНК-гибрида и рядом с ним, но лишена шпильки. Если к такому собранному комплексу добавить антисмысловую РНК,

88

которая будет комплементарна 5'-концу транскрипта, то сформируется РНК/РНК-дуплекс, который хорошо имитирует полноценный ЭК при формировании шпилько-зависимых пауз (Nayak et al., 2013, Hein et al., 2014).



Рисунок 4.7. Роль РНК-дуплекса при формировании hisP. (A) Структура олигонуклеотидной конструкции, использованной в эксперименте. РНК, которая воссоздаёт транскрипт, показана красным цветом. Исходный РНК-олигонуклеотид имеет размер 17 нт. и показан заглавными буквами. При добавлении ограниченного набора НТФ происходит удлинение РНК до размера 21 нт. (показано маленькими буквами). Стрелкой показана позиция паузы (19 нт.). При добавлении антисмысловой РНК (асРНК) происходит её отжиг на 5'-конец РНК-транскрипта и формируется РНК-дуплекс, который имитирует шпильку в сигнале паузы. (Б) Схема эксперимента. Вначале отжигают радиоактивно меченую по 5'-концу РНК на матрицу ДНК (мДНК), потом инкубируют с кор-ферментом. Сборку ЭК заканчивают добавлением олигонуклеотида, который выполняет функцию нематричной цепи ДНК (нмДНК). Образец делят на 2 части. В одну часть добавляют антисмысловой олигонуклеотид (acPHK). Далее измеряют продолжительность паузы методом транскрипции in vitro. (B) Кинетика паузы в присутствии и в отсутствие асРНК для РНКП дикого типа и РНКП с заменой D446A.

Вначале мы протестировали данную тест-систему на РНКП дикого типа (рисунок 4.7, таблица 4.3). Оказалось, что добавление антисмыслового олигонуклеотида приводит к увеличению как продолжительности паузы ($t_{1/2}$ 52,8 с и 10,6 с при наличии и в отсутствие РНКдуплекса, соответственно), так и максимальной эффективности её образования (85,9 и 58,3%, соответственно), что согласуется с опубликованными ранее результатами (Kolb et al., 2014).

Таблица 4.3. Значение времени полужизни *his*P ($t_{1/2}$, с) и максимальной эффективности образования паузы (P_{max}), в присутствии и в отсутствие антисыслового РНК-олигонуклеотида (асРНК).

РНКП	t _{1/2} (c)		P _{max} (%)		
	-асРНК	+acPHK	-асРНК	+acPHK	
WT	$10,6 \pm 2,5$	$52,8 \pm 5,1$	$58,3 \pm 12,0$	$85,9 \pm 1,8$	
D446A	$13,3 \pm 1,2$	$34,0 \pm 0,9$	$56,3 \pm 5,2$	$81,3 \pm 0,7$	

Эффект мутации D446A в системе с добавлением антисмыслового олигонуклеотида, который имитирует PHK-шпильку, напоминает её влияние на *his*P при инициации с промотора: время полужизни паузы уменьшается по сравнению с PHKП дикого типа (34 и 56,3 с, соответственно). В то же время, в отсутствие PHK-шпильки t_{1/2} для PHKП с заменой D446A оказывается не только не меньше, но даже немного больше, чем для PHKП дикого типа (13,3 и 10,6 с, соответственно). Это говорит о том, что структура PHK-транскрипта может модулировать взаимодействие CRE-кармана с сигналом паузы, что объясняет разный эффект мутации на разные классы пауз.

Ранние работы по исследованию сигналов пауз выявили, что для формирования шпилько-зависимых пауз важна позиция -1 (Chan et al., 1997). На структуре промоторного комплекса видно, что +1 основание нематричной цепи образует стэкинг-взаимодействие с консервативным остатком W183. Позиция +1 в промоторном комплексе соответствует положению -1 в ЭК. Мы решили проверить, принимает ли данный остаток участие в узнавании пиримидинового нуклеотида в -1 положении *his*P. Оказалось, что мутация W183A не влияет на продолжительность *his*-паузы, что говорит о том, что данное взаимодействие не нужно для формирования паузы, и роль пиримидинового нуклеотида в формировании паузы, вероятно, заключается в том, что он крепче удерживается в активном центре РНКП, чем пуриновый нуклеотид (Acuna-Alonzo et al., 2010).

4.1.4 Роль CRE-кармана в процессе терминации на терминаторе $\lambda tR2$

Поскольку мы выявили, что мутации в CRE-кармане умеренно влияют на скорость элонгации, а также на шпилько-зависимые паузы, то мы решили проверить возможную роль данного района в процессе фактор-независимой терминации, т.к. наблюдается некоторое сходство в сигналах шпилько-зависимых пауз и терминации. Для этого мы измерили эффективность терминации (доля продуктов терминации от общей суммы продуктов терминации и полноразмерного продукта) для РНКП дикого типа и мутантных полимераз на модельном терминаторе tR2 из бактериофага λ , который находился под контролем промотора T7A1. Ранее данный терминатор хорошо зарекомендовал себя как удачная модельная система, в которой терминация не происходит со 100% эффективностью *in vitro* (Gusarov and Nudler, 1999). Также было установлено, что эффективность терминации зависит от скорости элонгации (Peters et al., 2011). В целом, эффект мутаций в CRE-районе на терминацию находится в обратной корреляции с их влиянием на скорость элонгации (таблица 4.4). Замена W183A и делеция Δ 443-451 не оказывают существенного эффекта на терминацию. Замена E546A, которая увеличивает скорость элонгации, способствует снижению эффективности терминации, а делеция Δ 533-546, которая замедляет элонгацию, способствует более эффективной терминации транскрипции. Интересно, что замена D446A, которая не имеет заметного влияния на среднюю скорость элонгации, приводит к довольно сильному снижению эффективности терминации.

Таблица 4.4.	Эффективность	терминации	транскрипции н	на терминаторе	эλt _{R2} для	РНКП
дикого типа (WT) и РНКП, со	держащих му	тации в CRE-ка	рмане.		

РНКП	Эффективность	
	терминации (%)	
WT	50 ± 1	
	1	
D446A	34 ± 1	
	0,68	
E546A	41 ± 3	
	0,82	
W183A	53 ± 6	
	1,1	
Δ443-451	52 ± 5	
	1,0	
Δ533-546	69 ± 3	
	1,4	

Такой эффект можно объяснить тем, что остаток D446 образует контакты с ДНК, которые способствуют терминации. Кроме того, данная замена может подавлять образование паузы при терминации. Обе гипотезы методологически сложно проверить. Первая требует высококачественных данных рентгеноструктурного анализа терминирующего комплекса, которые на сегодняшний день отсутствуют. Паузу при терминации сложно "разобрать", как мы это делали со шпилько-зависимой паузой. Если из сигнала терминации убрать последовательность, при транскрипции которой формируется РНК-шпилька, возникает сильная обратная транслокация на У-тракте, которая сама по себе уже приводит к паузе (Esyunina et al.,

2015). Таким образом, пока механизм влияния замены D446A на фактор-независимую терминацию остаётся не ясен.

4.1.5 Влияние замен в CRE-кармане РНКП на рост бактериальных клеток

На заключительном этапе данного раздела исследования мы изучили влияние экспрессии β-субъединиц с мутациями в CRE-кармане на рост бактерий *E. coli*. Так как РНКП необходима для роста бактериальных клеток, то получение нокаутных штаммов с мутациями в кор-ферменте, инактивирующими РНКП, технически невозможно. Для того, чтобы изучать действие конкретной мутации в РНКП в отсутствие экспрессии фермента дикого типа с хромосомы, ранее была разработана элегантная система с температурочувствительным штаммом RL585. В данном штамме в последовательности гена β-субъединицы *гроВ*, закодированном в хромосоме, находится стоп-кодон. Также в клетках экспрессируется супрессорная тРНК, которая может узнавать последовательность стоп-кодона в рамке гена *гроВ*, и терминация трансляции не происходит. Данная тРНК при 42 °С денатурирует, и происходит преждевременная терминация трансляции β-субъединицы (Landick et al., 1990). Мы трансформировали клетки данного штамма плазмидами, экспрессирующими β-субъединицу дикого типа или с заменами в CRE-кармане (в качестве отрицательного контроля брали пустой вектор pBAD), в присутствии индуктора арабинозы и выращивали их при 42 °C. В соответствии с описанными в литературе данными, экспрессия гена *гроВ* дикого типа с плазмиды способствует росту клеток, при этом клетки с пустым вектором не растут (рисунок 4.8, Landick et al., 1990). Более того, экспрессия генов с точечными заменами E546A и D446A также способствует выживанию клеток. Таким образом, можно сказать, что РНКП с точечными мутациями способны поддерживать рост клеток на богатой среде. Такой функциональный тест косвенно свидетельствует, что введённые нами точечные мутации не оказали существенного влияния на пространственную структуру фермента и температурную устойчивость РНКП. В то же время, обе исследованные полимеразы с делециями не поддерживают рост бактерий. Более того, в контрольном эксперименте, в котором клетки, несущие данные плазмиды, выращивали при 30 °C, когда может экспрессироваться полноразмерная β-субъединица РНКП с хромосомы, мы обнаружили, что мутантные полимеразы с делециями значительно замедляют рост клеток (рисунок 4.8 А).

Также рядом с CRE-карманом находится место связывание антибиотика рифампицина, который специфически ингибирует инициацию транскрипции. Ранее в литературе были опубликованы данные, что мутации в позициях 447, 448, 533, 534, 536, 537 а также делеции Δ 531-533 и Δ 535-542 в β -субъединице придают бактериям устойчивость к рифампицину (Artsimovitch et al., 2005; Campbell et al., 2001; Jin and Gross, 1988).

92



Рисунок 4.8. Анализ влияния экспрессии β -субъединиц РНКП *E. coli* с мутациями в СREкармане на жизнеспособность клеток и устойчивость к антибиотику рифампицину. (A) Анализ выживаемости клеток *E. coli* штамма RL585 в условиях экспрессии мутантных РНКП. Данный штамм может экспрессировать РНКП с генома при температуре 30 °C, но не может при 42 °C. Таким образом, при данной температуре вся РНКП экспрессируется с плазмиды. Можно видеть, что РНКП с точечными мутациями в СRE-кармане способна поддерживать рост клеток в данных условиях, в то время как делеционные мутанты не только не поддерживают рост в данных условиях, но и оказывают токсический эффект на рост клеток при 30 °C. (Б) Анализ выживаемости клеток *E. coli* штамма DH5 α , экспрессирующих мутантные РНКП, в присутствии ингибитора транскрипции антибиотика рифампицина. Можно видеть, что при экспрессии двух делеционных мутантов в более жизнеспособном штамме появляется устойчивость к данному антибиотику.

Мы решили посмотреть, не придают ли наши мутации устойчивость бактериям к рифампицину. Для этого мы взяли более жизнеспособный штамм DH 5 α (RL585 растёт довольно медленно, вероятно, из-за плохо-контролируемой терминации трансляции). Наличие рифампицина в среде в концентрации более 10 мкг/мл полностью подавляет РНКП дикого типа, и вся транскрипция может осуществляться только мутантным ферментом (Campbell et al., 2001). Оказалось, что экспрессия мутантных полимераз E546A и D446A не придаёт бактериям устойчивость к данному антибиотику. В то же время, оказалось, что обе исследуемые делеции способствуют росту на среде с рифампицином. При этом РНКП Δ 533-546 даёт возможность клеткам расти даже при очень высокой концентрации 50 мкг/мл, что соизмеримо с эффектами мутаций, выделенных из клинических штаммов патогенных бактерий. По-видимому, такая разница в поведении штаммов DH 5 α и RL585, экспрессирующих β -субъединицы с делециями, обусловлена тем, что штамм RL585 обладает более низкой жизнеспособностью, и экспрессия мутантной полимеразы подавляет рост клеток.

4.2 Изучение пауз, вызванных σ³⁸-субъединицей

4.2.1 Изучение пауз, вызванных σ^{38} -субъединицей в синтетических ЭК

Согласно классическим представлениям, для осуществления продуктивной элонгации σ субъединица не нужна, и она стохастически диссоциирует от ЭК (Feklistov et al., 2014). В то же время, в случае РНКП *E. coli* главная σ^{70} -субъединица может оставаться связанной с транскрибирующим ЭК и принимать участие в узнавании промотор-подобных сигналов пауз, что может иметь регуляторное значение. Способны ли альтернативные σ -субъединицы вызывать паузы транскрипции, до настоящего времени оставалось неизвестным. Вторая часть нашей работы посвящена изучению пауз транскрипции, вызванных альтернативной σ^{38} субъединицей *E. coli*, которая имеет наибольшее сходство с главной σ^{70} -субъединицей.

Ранее было продемонстрировано, что σ^{70} -субъединица способна вызывать σ -зависимую паузу в +17 положении относительно точки старта на промоторе *lac*UV5 (Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2002). Во время данной паузы σ^{70} -субъединица взаимодействует с ЭК, но в некоторых условиях её можно удалить путём отмывания. При повторном добавлении σ^{70} субъединицы к комплексам, свободным от этого фактора, происходит повторное связывание σ^{70} -субъединицы, и ЭК вновь приобретает способность формировать паузу в той же позиции (Brodolin et al., 2004; Zenkin et al., 2007). Эти наблюдения послужили основой для разработки в нашей лаборатории модельной системы на базе промотора lacUV5, которая основана на сборке из кор-фермента РНКП и синтетических олигонуклеотидов полноценного ЭК с консенсусным сигналом о-зависимой паузы, который хорошо воспроизводит комплекс, образующийся после ухода фермента с промотора *in vitro* (Zhilina et al., 2012). Мы протестировали σ^{38} -субъединицу на способность вызывать паузу транскрипции в таком синтетическом комплексе, который содержит в качестве сигнала паузы последовательность TGCTATAAT (ЭК Cons). Эта последовательность является консенсусом удлинённого -10 элемента как для σ^{70} , так и для σ^{38} субъединиц (рисунок 4.9 A) (Maciag et al., 2011). Как можно видеть на рисунке 4.8 Б и В, σ^{38} субъединица с высокой эффективностью (около 70%) вызывает продолжительную паузу (t_{1/2} >> 10 мин), которая практически не наблюдается в её отсутствие (панели 1 и 2).

Ранее было показано, что замена L402F в σ^{70} -субъединице затрудняет её связывание с кор-ферментом и тем самым подавляет формирование σ -зависимой паузы (Ко et al., 1998). Мы получили соответствующую мутацию L117F в районе $\sigma^{2.2} \sigma^{38}$ -субъединицы. Как и ожидалось, такая мутация действительно приводит к снижению эффективности образования и продолжительности σ^{38} -зависимой паузы (рисунок 4.9 Б, панель 3). Далее мы проверили, действительно ли формирование паузы в нашей системе зависит от последовательности -10-подобного элемента. Для этого в сигнале -10-подобного элемента сделали замену АТ на GC (рисунок 4.9 А) и увидели, что она приводит к значительному ослаблению паузы (рисунок 4.9 Б

и В панель 4). Замена в ТG-элементе приводит к небольшому подавлению паузы, что говорит о том, что TG-элемент выполняет вспомогательное участие в формировании и стабилизации σ³⁸-зависимой паузы.



Рисунок 4.9. Исследование σ^{38} -зависимых пауз в синтетических ЭК. (А) Схема конструкции, использованной для сборки ЭК. В нематричной цепи находится -10-подобный элемент (показан розовым цветом), а также TG-элемент перед ним (показан зелёным), которые выступают в качестве сигнала паузы. Исходный 20-мер РНК показан красным цветом, продукты его удлинения до мажорной паузы (отмечена на схеме голубым цветом) показаны серым цветом. (Б) Транскрипция в синтетическом ЭК Cons и его вариантах, содержащих замену в -10-подобном (-10М, 4-я панель) и TG-элементах (5-я панель) в присутствии и в отсутствие σ^{38} -субъединицы дикого типа (панели 1 и 2, соответственно) или σ^{38} -субъединицы с заменой L117F (3-я панель). Стрелками обозначены исходная неудлинённая РНК и основные продукты транскрипции. Транскрипция с добавлением σ^{38} -субъединицы в присутствии факторов GreA или GreB показана на панели 6 и 7, соответственно. Электрофорез в 15% ПААГ. Снизу в виде столбчатой диаграммы показана эффективность образования паузы для каждой временной точки, выраженная в процентах.

Ранее было показано, что факторы GreA и GreB подавляют σ^{70} -зависимые паузы за счёт их способности реактивировать смещённые ЭК, стимулируя расщепление РНК-транскрипта в активном центре фермента (Marr and Roberts, 2000). Оказалось, что оба фактора подавляют открытую нами паузу, причём GreB делает это значительно сильнее. Такой эффект данных факторов говорит о том, что во время исследуемой паузы комплекс находится в смещённом состоянии (Borukhov and Goldfarb, 1993; Orlova et al., 1995). Известно, что GreA хорошо действует на смещённые на 1-2 нуклеотида комплексы, в то время как GreB действует лучше на более смещённые комплексы (Borukhov and Goldfarb, 1993). Из этого следует, что во время наблюдаемой паузы комплекс смещён более чем на 2 нт. Таким образом, наблюдаемая нами σ^{38} -зависимая пауза демонстрирует все известные ранее свойства для σ^{70} -зависимой паузы.

Ранее исследователи уже пытались определить, способна ли σ^{38} -субъединица вызывать паузу на матрицах, содержащих природный или синтетический сигнал паузы под контролем промотора главной о-субъединицы, однако им не удалось этого сделать (Marr et al., 2001; Sevostyanova et al., 2008). Эта неудача была объяснена авторами тем, что σ^{38} -субъединица имеет более низкую аффинность к кор-ферменту, чем σ^{70} -субъединица (Colland et al., 2002; Maeda et al., 2000). По их мнению, это должно приводить к снижению сродства σ^{38} -субъединицы и к ЭК al., 2008). Однако, как показывают структурные (Sevostyanova et исследования, пространственная организация ЭК отличается от холофермента; кроме того, не охарактеризованные взаимодействия σ-субъединицы с ДНК могут вносить свой вклад в стабилизацию ЭК в состоянии паузы, и по этим причинам такая аналогия может быть не совсем корректна (Vassylyev et al., 2007а). Анализ пространственной структуры промоторного комплекса, содержащего σ^{38} -субъединицу, показал, что контакты σ^{38} -субъединицы с ДНК и кор-ферментом очень похожи на контакты σ^{70} -субъединицы (см. ниже, рисунок 5.2) (Liu et al., 2016). Чтобы напрямую проверить, способна ли σ^{38} -субъединица связываться с ЭК, мы измерили константы диссоциации (K_d) для σ^{70} - и σ^{38} -субъединиц с ЭК Cons. Методом задержки в геле (рисунок 4.10 A) мы обнаружили, что добавление как σ^{70} -субъединицы, так и σ^{38} субъединицы приводит к изменению электрофоретической подвижности ЭК, причём при увеличении концентрации σ-субъединиц увеличивается доля комплекса с более медленной подвижностью, и постепенно практически весь комплекс переходит в менее подвижную форму. Сдвиг электрофоретической подвижности обусловлен связыванием осубъединиц. Если построить график зависимости доли связанного с о-субъединицей комплекса от концентрации, то кривая имеет типичную гиперболическую зависимость. Это позволило нам рассчитать значение *K*_d для связывания комплексов с каждой о-субъединицей. Оказалось, что аффинность этих двух σ-субъединиц к данному ЭК практически не различается, для σ⁷⁰-субъединицы значение $K_d = 220 \pm 80$ нМ, а для σ^{38} -субъединицы $K_d = 330 \pm 60$ нМ.



Рисунок 4.10. Сравнение эффективности связывания σ^{70} - и σ^{38} -субъединиц с ЭК в синтетическом ЭК Cons. (А) Анализ связывания σ -субъединиц методом задержки в геле. ЭК содержащий радиоактивно меченую РНК, инкубировали с σ -субъединицами в разных концентрациях и далее проводили разделение свободного ЭК от связанного ЭК (σ -ЭК) путём электрофореза в 5% ПААГ в нативных условиях (левая панель). На основании зависимости процента связанного комплекса от концентрации σ -субъединицы строили график (правая панель) и вычисляли значение K_d . (Б) Анализ связывания σ -субъединиц по эффективности образования паузы. Собранный ЭК инкубировали с σ -субъединицами, далее добавляли полный набор НТФ, синтез останавливали через 1 минуту после добавления субстратов. РНК-продукты разделяли в денатурирующем 15% ПААГ (левая панель) и строили зависимость доли комплекса в состоянии паузы от концентрации σ -субъединицы (правая панель).

Кроме того, значение K_d было измерено альтернативным способом по эффективности образования паузы. Как видно из рисунка 4.10 Б, увеличение концентраций σ -субъединиц приводит к увеличению эффективности формирования паузы вплоть до наступления насыщения (около 70% комплексов находилось в состоянии паузы). Измеренные таким методом значения K_d для σ^{70} - и σ^{38} -субъединиц составляют 145 ± 10 нМ и 320 ± 45 нМ, соответственно. Таким образом, значения констант диссоциации, полученные двумя разными методами, достаточно хорошо согласуются меду собой и указывают на то, что нет существенной разницы в аффинности этих двух σ -субъединиц к ЭК, содержащему -10-подобный элемент. Важно отметить, что внутриклеточная концентрация σ^{38} -субъединицы в стационарной фазе составляет около 3 мкМ, что значительно превышает измеренные нами

значения K_d (Jishage and Ishihama, 1995). Этот факт указывает на возможность формирования σ^{38} -зависимых пауз по механизму *in trans* в клетках во время стационарной фазы.

Также были измерены значения $K_d \sigma^{38}$ -субъединицы с ЭК, содержащими замены в -10подобном и TG-элементах (рисунок 4.11).



Рисунок 4.11. Анализ взаимодействий σ^{38} -субъединицы с ЭК, содержащими замену в -10подобном и TG-элементах. (А) Анализ связывания σ^{38} -субъединицы с ЭК -10М (где введены замены в -10-подобный элемент) и –TG (где отсутствует TG-элемент) методом задержки в геле в 5% ПААГ в нативных условиях. Как можно видеть, при замене в -10-подобном элементе (левая панель) не происходит ассоциации σ^{38} -субъединицы с ЭК. Исчезновение TG-элемента (правая панель) способствует ухудшению связывания σ^{38} -субъединицы с ЭК. (Б) Измерение эффективности формирования паузы в ЭК –TG при различных концентрациях σ^{38} -субъединицы. График зависимости эффективности образования паузы и связывания σ^{38} -субъединицы от её концентрации приведён на нижней панели справа.

В случае замены в -10-подобном элементе (-10М) полностью пропадает связывание σ^{38} субъединицы с ЭК при всех взятых концентрациях ($K_d >> 10$ мкМ). Это говорит о том, что именно специфическое узнавание -10-подобного элемента приводит к связыванию σ - субъединицы с ЭК. В то же время, замена в TG-элементе приводит к значительному возрастанию значения K_d , измеренного как методом задержки в геле, так и по эффективности образования паузы (900 ± 140 нМ и 525 ± 100 нМ, соответственно). Таким образом, снижение аффинности σ^{38} -субъединицы к ЭК, содержащим замены в -10-подобном и TG-элементах, объясняет негативный эффект этих замен на формирование паузы.

4.2.2 Изучение пауз, вызванных σ^{38} -субъединицей на промоторе adhE P1

Полученные нами данные показали возможность формирования в искусственной системе σ^{38} -зависимых пауз, которые обладают теми же свойствами, что и σ^{70} -зависимые паузы. Встаёт закономерный вопрос, а возможны ли такие паузы при инициации транскрипции с промотора, как это происходит в клетке? Мы решили посмотреть, есть ли -10-подобные элементы в последовательностях около точки старта у известных промоторов σ^{38} -субъединицы, собранных в базу данных Regulon (Salgado et al., 2013). Оказалось, что около 1/3 части (42 из 143 известных) природных промоторов имеют в начально-транскрибируемой области последовательности, которые содержат как минимум 5 совпадений с консенсусом -10 элемента, дополненного TG-элементом (мотив TGcTATA(A/C)T). Это позволило нам предположить, что данные последовательности могут узнаваться σ^{38} -субъединицей в качестве сигнала паузы. Для проверки этой гипотезы мы получили матрицы ДНК, содержащие промоторы adhE P1, ecnB P, glgS P1, talA P2 с начально транскрибируемым регионом, и протестировали их активность с холоферментом, содержащим σ^{38} -субъединицу. В случае первых двух промоторов мы обнаружили паузы транскрипции, которые находятся на расстоянии 10-12 нуклеотидов от -10подобного элемента (остальные два промотора были в наших условиях не активны). Наиболее ярким оказался результат с промотором *adhE* P1 (рисунок 4.12), где в +27 позиции с высокой эффективностью (около 47%) образуется очень продолжительная пауза ($t_{1/2} >> 5$ мин., нижняя панель, дорожки 1-4).

Замена +11 A на G во втором положении -10-подобного элемента приводит к практически полному исчезновению паузы, что подтверждает, что эта последовательность является частью сигнала паузы. Для того, чтобы удостовериться, что наблюдаемая нами пауза действительно является σ^{38} -зависимой, мы провели тест, в котором использовали мутантную σ^{38} -субъединицу, содержащую замену L117F. Ранее мы показали, что данная мутация подавляет формирование σ^{38} -зависимой паузы в синтетических ЭК Cons (см. выше). Оказалось, что сама по себе эта мутация снижает эффективность инициации транскрипции, как и в случае аналогичной замены L402F в σ^{70} -субъединице, вероятно, за счёт нарушений связывания σ^{38} -субъединицы с кор-ферментом (Ко et al., 1998). Но самым главным является тот факт, что эта замена приводит к практически полному исчезновению паузы в +27 положении (эффективность

паузы относительно полноразмерного продукта для σ^{38} L117F около 4%, в то время как для σ^{38} дикого типа около 47%).



Рисунок 4.12. Анализ σ^{38} -зависимой паузы в начальном транскрибируемом регионе промотора *adhE* P1. На верхней панели приведён фрагмент последовательности *adhE* P1, где показаны -10 элемент (розовый цвет), точка старта транскрипции (отмечена +1, жёлтый цвет) и -10-подобный элемент (фиолетовый цвет). Полноразмерный продукт обозначен RO и отмечен стрелкой. Знаком * отмечена пауза перед концом матрицы. При транскрипции с этого промотора наблюдается сильная пауза в +27 положении (дорожки 1-4). При замене +11А \rightarrow G в -10-подобном элементе происходит исчезновение данной паузы (дорожки 5-8). Мутация L117F в σ^{38} -субъединице значительно снижает относительное количество PHK-транскрипта размером 27 нт. (дорожки 9-12). Транскрипционный фактор GreB уменьшает данную паузу и стимулирует формирование продуктов расщепления смещённого транскрипта.

Кроме того, мы выявили мутацию в σ^{38} -субъединице, которая обладает противоположным эффектом, а именно, усиливает данную паузу (см. раздел 4.2.4), что дополнительно подтверждает этот факт. Также мы проверили, каким образом на исследуемую паузу действует транскрипционный фактор GreB. Как и ожидалось, это фактор подавляет формирование паузы. Таким образом, комплекс в состоянии паузы находится в смещённом состоянии. В целом, наши эксперименты указывают на то, что наблюдаемая нами пауза в +27 положении транскрибируемого района промотора *adhE* P1 является σ^{38} -зависимой. Интересно, что в случае инициации холоферментом с σ^{70} -субъединицей не наблюдается чёткой паузы в +27 положении, а появляется набор продуктов разной длины. Судя по положению полноразмерного продукта, точка старта транскрипции для промоторного комплекса РНКП с σ^{70} -субъединицей отличается от точки старта для комплекса с σ^{38} -субъединицей. Это указывает на то, что либо в данной матрице σ^{70} -субъединица узнаёт другой промотор, либо используется другая точка старта трансков с старта трансков с с точки старта на

одном промоторе, что говорит о том, что инициация с участием этих двух σ-субъединиц происходит по-разному. Это затрудняет интерпретацию наблюдаемого в случае σ⁷⁰- субъединицы паттерна РНК-продуктов.

4.2.3 Исследование σ³⁸-зависимой паузы на промоторе adhE P1 методом перманганатного футпринтинга

Для выявления перехода от открытого промоторного комплекса к комплексу в состоянии паузы на промоторе *adhE* P1 мы использовали метод перманганатного футпринтинга. Ионы перманганата окисляют остатки тимина в одноцепочечной ДНК до тимингликоля, а последующая обработка пиперидином приводит к разрывам в ДНК в месте модифицированного нуклеотида (Carpousis and Gralla, 1985). Это позволяет выявить расплавленные участки ДНК. В нашем эксперименте мы использовали два варианта промотора *adhE* P1: промотор дикого типа, и промотор, содержащий замену +11G, которая приводит к исчезновению паузы в +27 положении. Эксперимент был проведён с σ^{38} -субъединицей дикого типа, а также с σ^{38} субъединицей с заменой L117F, которая подавляет формирование паузы. Как можно видеть на рисунке 4.13, в контрольных пробах, не содержащих холофермент (дорожки 2 и 7), не происходит плавления двуцепочечной ДНК в матрице. Как и ожидалось, при образовании промоторного комплекса происходит плавление ДНК в области точки старта в области от -11 до +1 (дорожки 3,5,8), но не происходит плавления в области -10-подобного элемента, что говорит о том, что холофермент не распознаёт в данных условиях этот сигнал в качестве промотора. При добавлении НТФ практически весь фермент уходит с промотора, о чём говорит ослабление сигнала в расплавленной области промотора. При этом на промоторе дикого типа в присутствии σ³⁸-субъединицы дикого типа наблюдается появление нового расплавленного участка в ожидаемом положении сигнала паузы (дорожка 4), что говорит об остановке ЭК в месте паузы. Позиция модифицированных остатков тимина соответствует смещённому элонгационному комплексу (рисунок 4.13 А, нижняя панель). Это согласуется с нашими данными о том, что комплекс в состоянии паузы чувствителен к добавлению фактора GreB. В случае РНКП, содержащей замену L117F в σ^{38} -субъединице, мы также наблюдаем плавление ДНК на промоторе, но при добавлении НТФ мы не видим расплетания ДНК в области сайта паузы, что объясняется неспособность σ^{38} -субъединицы с данной заменой индуцировать паузу транскрипции. В случае матрицы с заменой +11G мы видим плавление ДНК в области точки старта, но, в то же время, не наблюдаем плавления в позициях +13 и +14, характерных для комплексов в состоянии паузы. Таким образом, проведённый эксперимент позволил детектировать комплекс в состоянии паузы, который имеет характерную область плавления ДНК, обусловленную узнаванием -10-подобного элемента σ^{38} -субъединицей и обратной транслокацией ЭК.



4.13. Анализ формирования открытого промоторного Рисунок комплекса комплекса в состоянии с³⁸-зависимой паузы элонгационного метолом KMnO₄ футпринтинга. (А) Схематическое изображение промоторного пузыря (верхний рисунок) и ЭК в состоянии паузы (нижний рисунок). РНК-транскрипт показан красным цветом, место расщепления РНК фактором GreB указано стрелочкой. -10-подобный элемент показан малиновым цветом, положение паузы (σР) голубым. Позиции модифицируемых остатков тимина показаны треугольничками. (Б) Анализ перманганатного расщепления, электрофорез в 17% ПААГ. Промоторный комплекс был сформирован с σ^{38} -субъединицами дикого типа (WT, дорожки 3, 4, 8, 9) и с заменой L117F (обозначена на рисунке для краткости 117, дорожки 5 и 6), на промоторе дикого типа (дорожки 3-6) или содержащем замену +11G (дорожки 8 и 9). Для наблюдения за переходом от промоторного комплекса к элонгационному в реакционную смесь добавляли полный набор НТФ (дорожки 4, 6, 8). Позиции модифицированных остатков тимина идентифицировали путём сравнения длины продуктов с маркёром, полученным путём расщепления данной матрицы по позициям А и G методом Максама-Гилберта.

4.2.4 Изучение механизмов связывания σ^{38} -субъединицы с ЭК при формировании паузы на промоторе adhE P1

Предыдущие исследования выявили, что при инициации транскрипции с промотора σ^{70} субъединица вызывает паузу по механизму in cis, когда сигнал паузы узнаёт та молекула осубъединицы, которая участвовала в инициации и осталась связанной с ЭК после ухода с промотора (Marr et al., 2001). В то же время, было показано, что в определённых условиях может происходить присоединение *in trans* другой молекулы σ^{70} -субъединицы, когда она заново связывается с ЭК в процессе синтеза РНК (Goldman et al., 2015). Эксперименты с синтетическими элонгационными комплексами позволили выявить, что присоединение σ^{38} субъединицы и σ^{70} -субъединицы к ЭК *in trans* происходит похожим образом. Для того, чтобы выявить, какая из возможных моделей взаимодействия σ^{38} -субъединицы с ЭК реализуется при формировании паузы в +27 положении на матрице с промотором *adhE* P1, мы проанализировали влияние концентрации σ^{38} -субъединицы на эффективность образования паузы (рисунок 4.14 А). Как и ожидалось, эффективность инициации с промотора сильно зависит от концентрации σ^{38} -субъединицы, но относительное количество комплекса в состоянии паузы остаётся практически постоянным (рисунок 4.14 А и Б). Это свидетельствует в пользу того, что после ухода с промотора σ^{38} -субъединица остаётся связанной с ЭК и узнаёт сигнал паузы *in cis*.



Рисунок 4.14. Анализ механизма ассоциации σ^{38} -субъединицы с ЭК при инициации с промотора *adhE* P1. (А) Анализ эффективности образования σ^{38} -зависимой паузы при различных концентрациях σ^{38} -субъединицы. Электрофорез в 15% ПААГ. (Б) График зависимости эффективности образования паузы при различных концентрациях σ^{38} субъединицы при инициации с промотора *adhE* P1 и в контрольном эксперименте по ассоциации σ^{38} -субъединицы с синтетическим элонгационным комплексом (рисунок 4.15А). (В) Сравнение эффективности образования пауз на промоторе *adhE* P1 для σ^{38} -субъединицы дикого типа и σ^{38} -субъединицы, содержащей делецию района $\sigma^{3.2}$.

Контрольный эксперимент с синтетическим ЭК, сконструированным на базе промотора adhE P1 (рисунок 4.15 A), показал характерную гиперболическую зависимость эффективности паузирования от концентрации σ^{38} -субъединицы. Значение K_d для связывания σ^{38} -субъединицы с ЭК составило 490 ± 75 нМ (рисунок 4.15 В), что значительно больше, чем минимальная концентрация σ^{38} -субъединицы, использованная при инициации с промотора. Таким образом, связывание *in trans* оказывается менее выгодным.



Рисунок 4.15. Анализ σ-зависимых пауз в синтетическом ЭК, разработанном на основе промотора *adhE* P1. (А) Схема конструкции для сборки ЭК. -10-подобный элемент показан фиолетовым цветом, сайт паузы отмечен синим. Исходная РНК длиной 20 нт. изображена красным, добавленные при транскрипции до паузы нуклеотиды - серым. Позиции 20 и 24 нт. соответствуют позициям 23 и 27-мера при транскрипции с промотора. (Б) Кинетика удлинения РНК в отсутствие σ-субъединицы (панель 1), в присутствии σ^{70} (панель 2), σ^{38} дикого типа (WT, панель 3), $\sigma^{38} \Delta 3.2$ (панель 4) и σ^{38} L117F (панель 5). Эффективность паузы для каждой точки показана на диаграмме снизу. (В) Титрование σ^{70} , σ^{38} WT, $\sigma^{38} \Delta 3.2$ и σ^{70} в реакции транскрипции. Электрофорез в 15% ПААГ. Кривая титрования приведена на панели справа.

Согласно модели *in cis*, любое изменение эффективности диссоциации σ-субъединицы при уходе с промотора должно влиять на о-зависимую паузу. Для того, чтобы протестировать это предположение, мы проанализировали мутантный вариант σ^{38} -субъединицы, который содержал делецию остатков с 228 по 234 в районе σ3.2 (Δ3.2). Это район занимает РНКвыводящий канал в промоторном комплексе и в процессе инициации должен быть вытеснен оттуда растущим транскриптом для перехода от абортивного синтеза к синтезу полноразмерного продукта (Basu et al., 2014; Liu et al., 2016). Ранее было продемонстрировано, что делеция района σ 3.2 в σ ⁷⁰-субъединице подавляет её диссоциацию от ЭК, что приводит к усилению σ^{70} -зависимой паузы (Pupov et al., 2014). Мы протестировали влияние делеции района σ 3.2 на эффективность образования паузы на промоторе *adhE* P1. Оказалось, что данная мутация приводит к усилению паузы на 10-15%. Контрольный эксперимент по измерению эффективности образования паузы и аффинности σ^{38} -субъединиц дикого типа и $\Delta 3.2$ к синтетическому ЭК на основе промотора *adhE* P1 показал, что они одинаково эффективно вызывают паузу (около 70%) и имеют совпадающие значение K_d (490 ± 75 и 410 ±77, соответственно, рисунок 4.15 В). Таким образом, различия в эффективности образования паузы для этих двух σ^{38} -субъединиц нельзя объяснить тем, что $\sigma^{38}\Delta 3.2$ лучше узнаёт сигнал паузы. Наиболее вероятной причиной усиления паузы в +27 положении при инициации с промотора *adhE* P1 при участии σ^{38} -субъединицы с делецией района 3.2 является то, что данная мутация приводит к нарушению диссоциации σ-субъединицы при переходе к элонгации, что также свидетельствует в пользу реализации механизма in cis.

4.2.5 Исследование σ^{38} -зависимой паузы на промоторе еспВ Р1

Промотор гена алкогольдегидрогеназы *adhE* P1 не был единственным промотором, на котором мы сумели детектировать σ^{38} -зависимую паузу. Мы обнаружили, что после инициации с промотора гена *ecnB*, который относится к системе токсин-антитоксин, наблюдается множество пауз (рисунок 4.16). Из них пауза в +17 и +18 положении является σ^{38} -зависимой. Об этом говорит тот факт, что пауза подавляется мутацией L117F в σ^{38} -субъединице, а также чувствительна к замене +5A \rightarrow G в -10-подобном элементе (рисунок 4.16 Б). Данная пауза слабее, чем в случае σ^{38} -зависимой паузы в +27 положении при инициации с промотора *adhE* P1, что, вероятнее всего, объясняется тем, что -10-подобный элемент около точки старта промотора *adhE* P1 имеет консенсусный вид, в то время как в случае промотора *ecnB* содержит неконсенсусные замены. Интересно, что делеция в районе 3.2 σ^{38} -субъединицы усиливает данную паузу в 2-3 раза. Этот эффект сильнее, чем на промоторе *adhE* P1, где наблюдалось усиление на 10-15%. По-видимому, в случае сильной паузы (когда последовательность -10-подобного элемента имеет консенсусный вид) на ранних стадиях элонгации многие комплексы

105

сохраняют σ^{38} -субъединицу, а в случае слабого сигнала паузы меньшая фракция ЭК ассоциирована с σ^{38} -субъединицей.





1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

Рисунок 4.16. σ^{38} -зависимые паузы при инициации с промотора *ecn*B P. (A) Схема промотора. -35 элемент показан голубым, -10 – красным, -10-подобный элемент - фиолетовым цветом. Точка начала транскрипции показана жёлтым цветом. Позиция σ^{38} -зависимой паузы показана светло-голубым цветом. Позиции дополнительных пауз неизвестной природы указаны серым. (Б) Анализ σ^{38} -зависимой паузы при инициации с промотора *ecn*B P дикого типа (дорожки 1-5), с заменой +5A \rightarrow G в -10-подобном элементе (дорожки 6-10) с участием σ^{38} -субъединиц дикого типа (дорожки 1-10), σ^{38} L117F (дорожки 11-15), σ^{38} Δ3.2 (дорожки 16-20) и σ^{70} -субъединицы (дорожки 21-25). Временные точки указаны в минутах. Профиль PHK-продуктов в точке 1 мин, нормализованный по интенсивности полноразмерного продукта (RO) показан слева. σ^{38} -зависимая пауза в позиции +17/+18 ослабевает при наличии замены +5G в -10-подобном элементе. Мутации L117F и Δ3.2 действуют противоположным образом на данную паузу. σ^{70} -субъединица плохо узнаёт данный промотор и не даёт хорошо детектируемой паузы в данной позиции.

Эксперименты по транскрипции с σ^{70} -субъединицей показали, что такой инициаторный комплекс малоактивен при переходе к элонгации, но синтезирует множество абортивных продуктов, что не даёт возможности посмотреть, может ли σ^{70} -субъединица вызывать паузу в этой же позиции (рисунок 4.16 Б).

4.2.6 Влияние замены +11G в сигнале паузы на матрице с промотором adhE P1 на экспрессию репортерного гена in vivo

Для того, чтобы оценить возможную роль σ^{38} -зависимой паузы транскрипции, мы сравнили эффективность экспрессии генов в двух конструкциях в системе *in vivo*. Первая конструкция содержала оперон бактериальной люциферазы под контролем промотора *adhE* P1 и ассоциированных с ним регуляторных элементов. Вторая конструкция содержала замену

+11А \rightarrow G в сигнале -10-подобного элемента (рисунок 4.17 А). Данная замена не влияет на эффективность инициации, но зато подавляет формирование паузы *in vitro* (раздел 4.2.2). Мы сравнили эффективность экспрессии оперона люциферазы по интенсивности люминесценции штаммов *E. coli*. Рост клеток производился в анаэробных условиях, т.к. ранее было показано, что в этих условиях происходит активация транскрипции с промотора *adhE* P1 при участии σ^{38} субъединицы (Aristarkhov et al., 1996; Membrillo-Hernandez and Lin, 1999; Mikulskis et al., 1997).



Рисунок 4.17. Влияние сигнала σ^{38} -зависимой паузы на экспрессию репортерного гена. (A) Последовательности начально транскрибируемых районов промоторов *adhE* P1 *ecnB* P. Точка начала транскрипции (обозначена +1) показана синим цветом, -10-подобный элемент розовым цветом. Позиции пауз отмечены латинской буквой Р. Сайты связывания белков-репрессоров транскрипции Cra и OmpR отмечены фигурной скобкой. (Б) Анализ активности промотора adhE P1 и ассоциированных с ним районов in vivo. Схема конструкции представлена сверху. Под контролем промотора *adhE* P1 находится последовательность σ³⁸-зависимой паузы и оперон люциферазы из бактерии P. luminescens. В последовательность -10-подобного элемента которая приводит к значительному ослаблению паузы in vitro. вносилась замена, Анализировали зависимость интенсивности люминесценции, пронормированной оптическую плотность (Lux/OD), от оптической плотности, которая отражает стадию роста культуры, в клетках, несущих сигнал σ^{38} -зависимой паузы дикого типа (WT) и с заменой +11А→G. Из графика видно, что замена +11G, которая подавляет паузу в +27 положении, приводит к снижению уровня экспрессии репортерного гена.

Мы увидели, что экспрессия происходит в обоих случаях, но при замене в сигнале паузы её эффективность падает примерно в 2 раза для всех временных точек. В условиях роста в анаэробных условиях, при ограниченном наборе питательных веществ, с учётом того, что алкогольдегидрогеназа, экспрессия которой контролируется данным районом, является одним из ключевых генов метаболизма в отсутствие кислорода, такие различия могут иметь важное значение.
5 ОБСУЖДЕНИЕ

Приведённые нами данные демонстрируют, что специфические взаимодействия РНКП с нематричной цепью ДНК в транскрипционном комплексе нужны для узнавания сигналов пауз. При этом, если о роли -10-подобного элемента в качестве сигнала σ^{70} -зависимых пауз известно довольно давно, то роль контактов РНКП с СRE стала объектом исследования только в последние несколько лет.

Мы продемонстрировали, что специфические взаимодействия РНКП с передним краем транскрипционного пузыря (CRE) важны на всех стадиях транскрипции. Роль таких взаимодействий обобщена на рисунке 5.1. Активный центр фермента содержит два функциональных сайта: *i*- и i+1,- и может находиться в двух основных конформациях, пре- и посттранслокационной (раздел 2.4.4). В случае открытого промоторного комплекса в этих сайтах размещаются +1 и +2 нуклеотиды (Basu et al., 2014).



Рисунок 5.1. Модель взаимодействий СRE с РНКП на разных стадиях транскрипции. РНКП схематично изображена жёлтым овалом. СRE-карман показан зелёным цветом. Домен β flap показан синим полуовалом. Канал связывания ДНК спереди от АЦ указан серым цветом. Остаток гуанина, узнаваемый CRE-карманом, показан красным цветом. На схеме отмечены позиции *i*, *i*+1 и *i*+2. Для каждого комплекса показано в каком состоянии он находится: пре- или посттранслокационном. (А) Связывание +2G стабилизирует открытый промоторный комплекс. (Б) ЭК во время консенсусной паузы находится в претранслокационном состоянии. (В) Взаимодействие +1G с CRE-карманом способствует транслокации и переходу комплекса из состояние паузы в активное состояние. (Г) РНК-шпилька, сформированная в РНК-выводящем канале, влияет на взаимодействие +1G с CRE-карманом. Это может происходить за счёт изменений конформации домена сlamp и положения ДНК-дуплекса и нематричной цепи, что приводит к стабилизации состояния *his*-паузы либо путём подавления транслокационном состояний рисунок), либо путём ингибирования включения нуклеотидов в посттранслокационном состоянии состояния включения нуклеотидов в посттранслокационном состоянии.

Аналогичным образом расположены субстраты в посттранслокационном комплексе, когда в *i*-сайте находится 3'-конец РНК, а в i+1 располагается входящий нуклеотид. После включения нуклеотида оба сайта заняты растущей РНК. Имеющиеся данные свидетельствуют, взаимодействия CRE-кармана с нематричной цепью ДНК могут что влиять на конформационное положение активного центра и транслокацию. Если в нематричной цепи в +2 положении промотора присутствует остаток гуанина, то он размещается в CRE-кармане. Остатки D446 и E546 образуют прямые контакты с +2G. В пользу этого говорят структурные данные, а также наши результаты о том, что замены этих остатков приводят к уменьшению или полной потере способности РНКП узнавать остаток гуанина. Также можно сказать, что CREкарман в целом играет роль в поддержании стабильности промоторного комплекса. Мы показали, что мутации в этом районе приводят к снижению стабильности промоторного комплекса. Этот факт можно объяснить тем, что мутации приводят к потере контактов с нематричной цепью ДНК. В пользу этого также говорят некоторые опубликованные ранее данные. Так, делеция Δ436-445 в β-субъединице *E. coli*, которая частично перекрывается с ∆443-451, изученной в данной работе, приводила к нарушениям формирования транскрипционного пузыря около точки старта транскрипции, вероятно, также за счёт потери контактов РНКП с ДНК (Nechaev et al., 2000). Расположенный рядом с CRE-карманом остаток W183, который консервативен у бактерий, также принимает участие в формировании о промоторного комплекса, т.к. замена W183A приводит к значительному снижению стабильности промоторного комплекса.

В ходе процесса элонгации взаимодействие CRE-кармана с ДНК позволяет модулировать транскрипционные паузы. При этом в зависимости от типа паузы результат таких взаимодействий может быть полностью противоположным. В случае консенсусных пауз, во время которых ЭК находится в претранслокационном состоянии (последовательность сигнала пауз не благоприятна для транслокации, раздел 2.5.2), взаимодействия +1G (рисунок 5.1. Б) с СRЕ-карманом способствуют переходу РНКП в посттранслокационное состояние и выходу из паузы (Vvedenskaya et al., 2014). Замена D446A способствует увеличению продолжительности консенсусной паузы (Vvedenskaya et al., 2014). Похожая ситуация наблюдается и в случае паузы при инициации транскрипции (Давид Дулин, личное сообщение). В то же время, вступая в противоречие с ранее предложенной анти-паузной ролью взаимодействий с CRE-кармана с +1G, мы обнаружили, что замены E546A и D446A, которые подавляют взаимодействия CREкармана с +1G, подавляют формирование *his*-пауз. При этом эффект мутации D446A зависит от формирования РНК-дуплекса В РНК-выводящем канале: В отсутствии дуплекса продолжительность паузы в случае мутантной РНКП не уменьшается. Ранее было показано, что образование шпильки приводит к увеличению продолжительности паузы за счёт стабилизации

конформации РНКП с открытым доменом clamp и предотвращает переход TL в закрытое состояние (Hein et al., 2014; Nayak et al., 2013). Более того, было показано, что во время *his*P ЭК находится в претранслокационном состоянии; таким образом, ДНК в +1 положении может находиться в двухцепочечном состоянии (Hein et al., 2014). В связи с этим возникает вопрос, каким именно способом происходит узнавание +1G, азотистое основание которого для размещения в CRE-кармане должно выпетливаться из одноцепочечной ДНК? Мы выдвигаем гипотезу, что конформационные перестройки, вызванные формированием РНК-шпильки, могут модулировать эффект +1G нуклеотида на формирование паузы двумя альтернативными путями (рисунок 5.1 Γ).

Первый путь (рисунок 5.1 Г, верхняя панель). Открытие домена clamp и связанные с этим значительные конформационные перестройки во всём ЭК приводят к изменению позиции ДНК дуплекса, что приводит к изменению пути нематричной цепи в расплавленном регионе, в результате чего увеличивается размер транскрипционного пузыря, а +1G улавливается CREкарманом. Это, в свою очередь, может затруднить транслокацию такого искажённого комплекса. Однако, недавние прямые измерения с помощью флуоресцентных аналогов нуклеотидов показали, что +1 пара оснований ДНК во время *his*P находится преимущественно в спаренном состоянии (Hein et al., 2014). Этот факт говорит о том, что описанное выше взаимодействие может протекать только в течение короткого времени.

Второй путь (рисунок 5.1 Г, нижняя панель). Считается, что в основе всех транскрипционных пауз лежит так называемая элементарная пауза, во время которой комплекс находится в посттранслокационном состоянии, в котором +1 пара нуклеотидов расплавлена (Weixlbaumer et al., 2013). В расплавленном состоянии +1G улавливается CRE-карманом. Такое взаимодействие может привести к затруднению связывания входящего нуклеотида в i+1 сайте, путём аллостерической передачи сигнала на находящиеся рядом элементы активного центра, такие как ВН и TL. Такие взаимодействия могут привести к образованию неустойчивой конформации, которая релаксирует путём возвращения в претранслокационное состояние (что стимулируется PHK-шпилькой), в котором PHKП не может включать новые HTФ в транскрипт.

Мутации в CRE-кармане значительно изменяют среднюю скорость элонгации. В согласии с этим, генетические данные свидетельствуют о том, что мутации D444G и H447R в РНКП *E. coli* способствуют снижению стабильности элонгационного комплекса во время столкновений репликативной вилки с РНКП (Baharoglu et al., 2010). Также установлено, что замены в CRE-кармане влияют на фактор-независимую терминацию, возможно, за счёт изменения продолжительности паузы, которая возникает на У-тракте. Эффект мутаций на терминацию хорошо коррелирует с их влиянием на *his*P. Снижение эффективности терминации

в случае полимераз, содержащих замены D446A и E546A, свидетельствует, о том, что контакты данных остатков с ДНК могут быть нужны для формирования паузы при терминации.

Также интересно, что в некоторых случаях замены в домене fork (часть которого образует CRE-карман) служат в качестве приспособления к неблагоприятным условиям. Так, в случае организма *N. gerenzanensis* смена β-субъединиц в РНКП приводит к значительному изменению в экспрессии генов и, как следствие этого, глобальному изменению метаболизма в ответ на изменение pH окружающей среды. В качестве основной β-субъединицы данный организм использует продукт экспрессии гена *гро*В(S) – β-субъединица дикого типа. При защелачивании среды происходит экспрессия второго варианта β -субъединицы, гена *гро*В (R). Этот вариант отличается от гена rpoB(S) 11 мутациями, 5 из которых приходится на домен fork и ассоциированы с CRE-карманом (D'Argenio et al., 2016). Одним из возможных объяснений этого феномена может быть тот факт, что замены приводят к снижению стабильности промоторного комплекса. При этом те промоторы, которые образуют более прочные контакты с РНКП, получают преимущество при экспрессии генов по сравнению с малостабильными. Следует отметить, что данная гипотеза пока не имеет экспериментальных подтверждений. Другим примером адаптации может служить появление при культивации в среде с сублетальными концентрациями антибиотика ципрофлоксацина устойчивых бактерий E. coli, которые содержат дупликацию остатка S455 или делецию остатков 442-445 в CRE-кармане βсубъединицы. Мишенью данного препарата является топоизомеразы II и IV, но не РНКП. Причина появления устойчивости к данному антибиотику состоит в том, что происходит значительное повышение уровня экспрессии гена *mdt*K, кодирующего помпу, которая выкачивает лекарственные препараты из клетки. Это приводит к тому, что клетки, экспрессирующие такие мутантные полимеразы, становятся менее чувствительными к другим неродственным антибиотикам: левофлоксацину, хлорамфениколу, фосфомицину И тетрациклину (Pietsch et al., 2017). Это делает клетки очень устойчивыми к широкому ряду антимикробных препаратов, что может рассматриваться как новый механизм возникновения суперустойчивости к антибиотикам. Наконец, многие мутации в области CRE-кармана приводят к возникновению устойчивости к антибиотику рифампицину, мишенью которого является бактериальная РНКП (Artsimovitch et al., 2005; Campbell et al., 2001). Таким образом, CRE-карман – это важный район, который играет роль в регуляции транскрипции и устойчивости к антибиотикам. Его можно рассматривать как потенциальную мишень для разработки новых антибактериальных препаратов.

С учётом консервативности исследуемого района, функции CRE-кармана могут быть перенесены на эукариотические РНКП, которые гомологичны бактериальным. По структурным данным соответствующий белковый карман РНКП II *S. cerevisiae* также может вмещать

азотистые основания нематричной цепи (Cheung and Cramer, 2011). Мутации в CRE-кармане РНКП II значительно изменяют среднюю скорость элонгации. Было показано, что мутации в районе fork РНКП II *S. cerevisiae* нарушают взаимодействия с ДНК спереди по ходу транскрипции и влияют на транслокацию ЭК (Kireeva et al., 2011). Замена D370A во второй по размеру субъединице РНКП III *S. cerevisiae* (соответствует бактериальной β-субъединице), способствует снижению эффективности терминации, что напоминает эффект эквивалентной замены D446A в РНКП *E. coli* (Bobkova et al., 1999).

Другим интересным примером регуляции транскрипции, изученным в нашей работе, являются σ-зависимые паузы. Этот феномен позволяет рассматривать σ-субъединицу не только в качестве обязательного участника процесса инициации, но и как факультативный элонгационный фактор. Несмотря на ранее опубликованные данные о том, что альтернативная σ^{38} -субъединица не способна вызывать паузы при инициации транскрипции с промоторов σ^{70} субъединицы (Marr et al., 2001; Sevostyanova et al., 2008), мы впервые продемонстрировали, что σ³⁸-субъединица может с высокой эффективностью вызывать паузу в синтетических ЭК, а также при инициации транскрипции с природных промоторов в системе *in vitro*. Хотя σ^{38} субъединица наиболее близка по последовательности к главной о-субъединице, она содержит замены в регионе σ2.2, который контактирует с β'-субъединицей. Результатом этих замен является более низкая аффинность σ^{38} -субъединицы к кор-ферменту по сравнению с σ^{70} субъединией, что, по мнению авторов предыдущих исследований, приводит к тому, что σ³⁸субъединица легче диссоциирует от ЭК при переходе от инициации к элонгации. Действительно, замены близлежащих аминокислотных остатков в σ^{70} -субъединице приводят к подавлению σ^{70} -зависимых пауз (рисунок 5.2 A). Однако, наши измерения значений K_d для обеих σ-субъединиц показали, что различия в связывании этих субъединиц с ЭК минимальные, особенно с учётом внутриклеточной концентрации σ^{38} -субъединицы в стационарной фазе, которая на порядок больше значения K_d. Также опубликованные ранее данные по хроматиниммунопреципитации показали, что часть ЭК в клетках *E. coli* содержат σ^{38} -субъединицу, что говорит о том, что её сродства к ЭК достаточно для формирования стабильных взаимодействий in vivo (Raffaelle et al., 2005).

Как показали недавние структурные исследования промоторного комплекса, содержащего σ^{38} -субъединицу, характер узнавания последовательности промотора, а также контакты σ^{38} -субъединицы с кор-ферментом крайне похожи на взаимодействия в промоторном комплексе *T. thermophilus* с σ^{A} -субъединицей (главная σ -субъединица, ортолог σ^{70} -субъединицы) (рисунок 5.2 Б, Liu et al, 2016). Это дополнительно свидетельствует в пользу наших данных об отсутствии принципиальных различий во взаимодействиях главной (σ^{70} или σ^{A}) и альтернативной σ^{38} -субъединиц с ЭК. Такое сходство объясняет схожесть эффектов

мутации L117F в σ^{38} -субъединице и соответствующей ей мутации L402F в σ^{70} -субъединице на эффективность формирования σ -зависимых пауз. На структуре промоторных комплексов σ^{38} - и σ^{A} -холоферментов остатки L117 и L210 (соответствует остатку L402 в σ^{70} -субъединице *E. coli*) контактируют с β'CC районом (рисунок 5.2 Б). Замены этих остатков приводят к нарушениям связывания σ -субъединицы с кор-ферментом, что объясняет наблюдаемые эффекты.



Рисунок 5.2. Взаимодействия региона σ^2 с -10 элементом промотора и кор-ферментом РНК. (A) Выравнивание регионов $\sigma^2 \sigma^{70}$, σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} *E. coli* и σ^A *T. thermophilus*. Показаны подрайоны района σ^2 . Идентичные остатки для σ^{70} и σ^{38} выделены жирным шрифтом. Остатки, замены которых нарушают взаимодействия σ с кор-ферментом, выделены оранжевым цветом; те из них, которые различаются у σ^{70} и σ^{38} -субъединиц, показаны серым цветом, один из них также заменён в σ^A *T. thermophilus*. Остатки L402 и L117 выделены красным цветом. Сверху красным цветом обозначены мутации, которые нарушают σ^{70} -зависимые паузы. (Б) Структура промоторного комплекса σ^A *T. thermophilus* (Basu et al., 2014) и σ^{38} *E. coli* (Liu et al., 2016). Нуклеотидные остатки -10 элемента показаны голубым и пронумерованы. Цветовые обозначения аминокислотных остатков аналогичны панели A. Район β ' СС показан зелёным цветом.

Свойства σ^{38} -зависимых пауз очень напоминают ранее установленные свойства для σ^{70} зависимых пауз. В обоих случаях для формирования паузы необходимо наличие в ДНК -10подобного элемента. Его узнавание приводит к тому, что ЭК после синтеза нескольких нуклеотидов переходит в смещённое состояние. В пользу этого говорит тот факт, что комплекс в состоянии паузы чувствителен к Gre факторам, а также данные перманганатного футпринтинга. Интересно, что у лямбдоидных фагов в +1 положении относительно σ^{70} - зависимой паузы находится остаток G, который влияет на её формирование. Это косвенно свидетельствует о том, что в случае σ^{70} -зависимых пауз CRE-карман участвует во взаимодействиях с нематричной цепью ДНК (Strobel and Roberts, 2014, 2015). В то же время, в случае σ^{38} -зависимой паузы на промоторе *adhE* P1 в сигнале паузы нет остатка G в +1 позиции, и, значит, такие взаимодействия не нужны для формирования σ^{38} -зависимой паузы. Тем не менее, в опытах с синтетическими ЭК, даже в отсутствие σ -субъединицы наблюдается слабая пауза не установленной природы, которая теоретически может способствовать формированию σ^{38} -зависимой паузы.

Наши данные говорят о том, что феномен σ -зависимых пауз может рассматриваться шире, чем область сигмулона главной σ^{70} -субъединицы. Однако, способность остальных σ -субъединиц σ^{70} -семейства индуцировать формирование пауз остаётся предметом для дальнейших исследований.

Многолетнее изучение σ^{70} -зависимых пауз в системах *in vitro* и *in vivo* привело к тому, что механизм их формирования в общих чертах понятен, а существование такого явления не вызывает сомнений. По проведённым оценкам, примерно 10-20% промоторов *E. coli* содержат σ^{70} -зависимую паузу (Deighan et al., 2011; Hatoum and Roberts, 2008). Также было показано, что РНКП из филогенетически далёких от энтеробактерий организмов, таких как *T. aquiticus* и *Deinococcus radiodurans*, тоже способны узнавать сигналы данных пауз (Agapov et al., 2017; Zhilina et al., 2012). Таким образом, распространённость этого явления как у различных видов, так и в геноме одного организма, наводит на мысль о важной биологической роли такой разновидности транскрипционных пауз. Однако, хотя исследования других видов пауз показали, что они оказывают важнейшее регуляторное влияние на транскрипцию и ассоциированные с ней процессы, функции σ -зависимых пауз в основном остаются не известны. В литературе были предложены некоторые возможные гипотезы, из которых экспериментальные подтверждения на сегодняшний день получила только одна (но другие ей не противоречат). Ниже мы рассмотрим существующие гипотезы о возможных функциях σ -зависимых пауз (рисунок 5.3).

1) Как было показано ранее, наличие сигнала σ -зависимой паузы приводит к стабилизации связывания σ -субъединицы с ЭК и тем самым способствует тому, что дальнейшая транскрипция нижележащих генов осуществляется комплексом σ -ЭК (рисунок 5.3 A) (Deighan et al., 2011). Также известно, что σ -субъединица может вновь присоединиться к свободному ЭК как *in vitro*, так и *in vivo* (Goldman et al., 2015). Увеличение доли ЭК, содержащих σ -субъединицу, приводит к узнаванию сигналов σ -зависимых пауз, а также потенциально может влиять на узнавание сигналов пауз других классов и терминации (Deighan et al., 2011; Goldman et al., 2015). Некоторые исследования говорят о том, что после завершения транскрипции, если

σ-субъединица остаётся связанной с ЭК, то это ускоряет наступление следующего раунда транскрипции за счёт сокращения времени образования холофермента из свободных корфермента и σ-субъединицы или за счёт облегчения диссоциации комплекса во время терминации (Arndt and Chamberlin, 1988; Bar-Nahum and Nudler, 2001).

2) Как показали исследования *in vivo*, наличие связанной с ЭК σ-субъединицы препятствует ассоциации с ним универсального транскрипционного фактора NusG и его генспецифичного паралога RfaH, которые взаимодействуют с тем же самым участком корфермента, что и о-субъединица (рисунок 5.3 Б). Оба фактора не оказывают влияния на инициацию транскрипции, но, в то же время, предотвращают дальнейшую реассоциацию σсубъединицы с ЭК (Sevostyanova et al., 2008). И напротив, наличие сигнала σ-зависимой паузы может предотвратить связывание этих двух транскрипционных факторов. Поскольку NusG играет ключевую роль в терминации транскрипции, координации транскрипции и трансляции, взаимодействуя напрямую как с р-фактором, так и с рибосомой, то его исключение из транскрипции за счёт связывания σ-субъединицы с ЭК может оказать значительное влияние на экспрессию генов. Родственный ему белок RfaH привлекается к ЭК во время ops-паузы на сайтах ops и подавляет узнавание нижележащих сигналов паузы и терминации, а также стимулирует трансляцию (Burmann et al., 2012). Стоит отметить, что только один из 34 известных промоторов, которые содержат в транскрибируемой области сигнал ops, имеет рядом с точкой старта сигнал, напоминающий -10-подобный элемент. Этот факт свидетельствует в пользу гипотезы о том, что формирование озависимой паузы и связывание осубъединицы с ЭК будет нежелательно для транскрипции данных генов, т.к. будет препятствовать присоединению фактора RfaH.

3) Единственной экспериментально доказанной функцией σ-зависимых пауз является привлечение антитерминационного фактора лямбдоидных бактериофагов (рисунок 5.3 В). Во время σ-зависимой паузы фактор Q узнаёт свой сигнал связывания с ДНК и связывается с ЭК, который остановлен рядом благодаря данной паузе. Несмотря на отсутствие в литературе информации, нельзя исключить, что подобный механизм может иметь место при регуляции не только фаговых, но и бактериальных генов.

4) Паузы потенциально могут подавлять неконтролируемую инициацию с того же самого промотора, на котором произошёл первый акт инициации, а также активировать молчащие промоторы, частью которых теоретически может выступать -10-подобный элемент (рисунок 5.3 Г). Подобная роль промотор-проксимальных пауз была недавно открыта у эукариот в случае РНКП II (Shao and Zeitlinger, 2017).



Рисунок 5.3. Возможные пути регуляции транскрипции при помощи σ -зависимых пауз. (A) σ -субъединица может оставаться связанной с ЭК и способствовать образованию пауз транскрипции, а также диссоциировать и повторно связываться с ЭК. (Б) Связанная с ЭК σ субъединица препятствует ассоциации с РНКП транскрипционных факторов NusG и RfaH, которые имеют тот же сайт посадки на кор-фермент, что и σ -субъединица, и играют важную роль в регуляции пауз и терминации. (В) Во время σ -зависимой паузы происходит присоединение транскрипционного фактора Q бактериофага λ , который подавляет узнавание сигналов пауз и терминации. Данный механизм регуляции является единственным экспериментально доказанным. (Г) Во время промотор-проксимальной паузы ЭК стерически препятствует посадке РНКП на находящийся рядом промотор. Также, возможно, это препятствует узнаванию молчащих промоторов, в которых сигнал паузы соответствует -10элементу. (Д) Промотор-проксимальные паузы могут препятствовать связыванию белкарепрессора за счёт стерического блокирования его связывания с ДНК, тем самым усиливая дальнейшую транскрипцию.

Также с учётом того, что альтернативные σ-субъединицы регулируют экспрессию генов в ответ на стресс, можно предположить, что наличие сильной промотор-проксимальной паузы, как например, открытая нами пауза в +27 положении промотора *adhE* P1, может служить для быстрого запуска экспрессии генов в ответ на внезапный стресс, например, путём снятия ареста транскрипционным фактором GreB. Похожий механизм регуляции генов известен у эукариот в случае промотор-проксимальной паузы в гене теплового шока у *Drosophila melanogaster* (Jonkers and Lis, 2015).

5) Наконец, мы предлагаем новую модель, согласно которой σ-зависимая пауза может регулировать транскрипцию за счёт того, что РНКП во время остановки занимает сайт связывания репрессора транскрипции, что может способствовать последующей инициации транскрипции (рисунок 5.3 Д). Мы обратили внимание, что при формировании пауз контролем промоторов *adhE* P 1 и *ecnB* P ЭК частично или полностью закрывает сайт посадки репрессоров Ста и OmpR (рисунок 4.17 A). В пользу этой модели говорит тот факт, что замена +11G снижает уровень экспрессии репортерного гена. Разумеется, приведённое нами объяснение не является единственным. Можно предположить, что замена +11А→G нарушает активность промотора, в качестве -10 элемента которого выступает сигнал паузы. Однако, предыдущие исследования по картированию старта транскрипции в данном районе *in vivo* не выявили наличие дополнительной точки старта в данном месте (Aristarkhov et al., 1996). Также моделирование вторичной структуры РНК и анализ её влияния на трансляцию показывает, что наиболее значимыми для этого процесса являются удалённые от +11 положения элементы (Aristarkhov et al., 1996), что позволяет предположить, что введённая нами замена не оказала существенного эффекта на трансляцию за счёт возможного изменения структуры транскрипта. Кроме того, нельзя исключить, что замена может влиять на стабильность РНК. Хотя описанные выше рассуждения не могут полностью опровергнуть альтернативные объяснения наблюдаемого эффекта, в пользу нашей гипотезы говорит тот факт, что рядом с доказанной или предсказанной σ-зависимой паузой часто локализуются сайты регуляторов транскрипции. Так, проведённый нами анализ промоторов и ассоциированных с ними регуляторных элементов по базам данных Regulon и EcoCyc выявил ассоциации -10-подобных элементов и сайтов транскрипционных репрессоров на промоторах lacUV5, galE P1, csgD P, hyaA P, frdA P, puuA P, puuD P. Таким образом, наблюдаемая нами связь между позициями сигнала паузы и сайтами связывания регуляторов транскрипции не является большой редкостью в геноме. Тем не менее, хотя озависимые паузы изучаются уже около 20 лет, достоверно известна лишь одна функция таких пауз – привлечение фактора Q у лямбдоидных фагов. Мы считаем, что наша гипотеза требует более глубокой экспериментальной проверки в системах *in vivo*, что может служить предметом для дальнейших исследований.

Таким образом, специфические взаимодействия РНКП с ДНК играют важную роль в регуляции как инициации, так и элонгации транскрипции. Одни и те же районы РНКП, которые участвуют в узнавании промотора, могут участвовать в узнавании сигналов пауз и терминации.

СRE-карман, а также σ^{70} или σ^{38} -субъединица являются важными сенсорами на наличие сигналов пауз и, возможно, последовательностей терминаторов. Установление структурных перестроек ЭК, с помощью которых сигнал паузы передаётся от распознающих элементов к активному центру РНКП, является задачей на ближайшие годы. Тем не менее, на основании данной работы и имеющихся в литературе данных можно сказать, что нематричная цепь ДНК принимает важнейшее участие в регуляции экспрессии генов, за счёт формирования специфических контактов с РНКП, которые приводят к паузам в синтезе РНК.

выводы

1) Мутации в CRE-кармане РНКП *Е. coli* влияют на все стадии транскрипции: снижают стабильность промоторных комплексов, изменяют скорость элонгации и эффективность терминации, вероятно, за счет нарушения контактов РНКП с нематричной цепью ДНК.

2) Контакты CRE-кармана РНКП с остатком гуанина в +1 положении нематричной цепи ДНК усиливают формирование транскрипционных пауз при наличии шпильки в РНК-транскрипте.

3) σ³⁸-субъединица вызывает паузы на стадии элонгации транскрипции в системах *in vitro*,
 взаимодействуя с -10-подобным элементом в нематричной цепи ДНК, что приводит к переходу
 элонгационного комплекса в смещённое состояние.

4) При инициации транскрипции на природных промоторах σ³⁸-субъединица способна вызывать промотор-проксимальные паузы по механизму *in cis*, оставаясь связанной с транскрипционным комплексом после перехода к элонгации транскрипции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность научному руководителю Андрею Владимировичу Кульбачинскому за интересную тему исследования, помощь в планировании работы и интерпретации данных, подготовку результатов к публикации и редактирование данной рукописи.

Благодарю Данила Владимировича Пупова за препараты белков, помощь в освоении методов, ценные замечания в ходе выполнения работы, а также за редактирование рукописи.

Благодарю Дарью Михайловну Есюнину за предоставление препаратов белков, плазмид, а также помощь в освоении методов.

Автор выражает благодарность Ирине Александровне Басс за предоставленные для работы плазмиды.

Благодарю Наталию Александровну Миропольскую за психологическую поддержку и понимание.

Благодарю Алексея Александровича Агапова за ценные советы по выделению белков.

Благодарю Анастасию Дмитриевну Огиенко за редактирование рукописи.

Выражаю благодарность Ирине Арцимович и Роберту Лэндику за предоставление плазмид, штаммов микроорганизмов, за прочтение рукописи статьи перед публикацией, а также за обсуждение результатов.

Благодарю Давида Дулина за обсуждение механизмов пауз при инициации транскрипции.

Автор благодарит всех сотрудников Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ИМГ РАН за тёплый приём в лаборатории, за единый коллективный дух, который очень стимулирует в работе. Благодарю всех сотрудников кафедры молекулярной биологии биофака МГУ за прекрасную школу и полученные знания.

Благодарю Российский Фонд Фундаментальных Исследований (РФФИ) и Российский Научный Фонд (РНФ) за материальную поддержку при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J.T., Borukhov, S., Wang, M.D., and Severinov, K. (2004). Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. Mol Cell 14, 753-762.
- 2. Agapov, A., Olina, A., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017). Gfh factors and NusA cooperate to stimulate transcriptional pausing and termination. FEBS Lett *591*, 946-953.
- 3. Alba, B.M., and Gross, C.A. (2004). Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. Molecular microbiology *52*, 613-619.
- Anthony, L.C., Foley, K.M., Thompson, N.E., and Burgess, R.R. (2003). Expression, purification of, and monoclonal antibodies to sigma factors from Escherichia coli. Methods in enzymology 370, 181-192.
- Aristarkhov, A., Mikulskis, A., Belasco, J.G., and Lin, E.C. (1996). Translation of the adhE transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in Escherichia coli. Journal of bacteriology 178, 4327-4332.
- Arndt, K.M., and Chamberlin, M.J. (1988). Transcription termination in Escherichia coli. Measurement of the rate of enzyme release from Rho-independent terminators. Journal of molecular biology 202, 271-285.
- Artsimovitch, I., and Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 7090-7095.
- Artsimovitch, I., Vassylyeva, M.N., Svetlov, D., Svetlov, V., Perederina, A., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Tahirov, T.H., and Vassylyev, D.G. (2005). Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. Cell *122*, 351-363.
- Baharoglu, Z., Lestini, R., Duigou, S., and Michel, B. (2010). RNA polymerase mutations that facilitate replication progression in the rep uvrD recF mutant lacking two accessory replicative helicases. Molecular microbiology 77, 324-336.
- Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A.E., Rafikov, R., Mustaev, A., and Nudler, E. (2005). A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. Cell *120*, 183-193.
- 11. Bar-Nahum, G., and Nudler, E. (2001). Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from Escherichia coli. Cell *106*, 443-451.
- Barbrook, A.C., Howe, C.J., Kurniawan, D.P., and Tarr, S.J. (2010). Organization and expression of organellar genomes. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 365, 785-797.

- Basu, R.S., Warner, B.A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernandez-Tornero, C., Kulbachinskiy, A., and Murakami, K.S. (2014). Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. The Journal of biological chemistry 289, 24549-24559.
- 14. Batada, N.N., Westover, K.D., Bushnell, D.A., Levitt, M., and Kornberg, R.D. (2004). Diffusion of nucleoside triphosphates and role of the entry site to the RNA polymerase II active center. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 17361-17364.
- 15. Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in Escherichia coli. Annual review of microbiology *65*, 189-213.
- Bauer, D.L.V., Duchi, D., and Kapanidis, A.N. (2016). E. Coli RNA Polymerase Pauses during Initial Transcription. Biophys J *110*, 21a-21a.
- 17. Bernecky, C., Herzog, F., Baumeister, W., Plitzko, J.M., and Cramer, P. (2016). Structure of transcribing mammalian RNA polymerase II. Nature *529*, 551-554.
- Borukhov, S., and Goldfarb, A. (1993). Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and in vitro assembly. Protein Expr Purif 4, 503-511.
- 19. Borukhov, S., and Nudler, E. (2008). RNA polymerase: the vehicle of transcription. Trends Microbiol 16, 126-134.
- 20. Borukhov, S., Sagitov, V., and Goldfarb, A. (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. Cell 72, 459-466.
- 21. Braun, V. (1997). Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. Archives of microbiology *167*, 325-331.
- Brodolin, K., Zenkin, N., Mustaev, A., Mamaeva, D., and Heumann, H. (2004). The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription. Nature structural & molecular biology 11, 551-557.
- Brueckner, F., and Cramer, P. (2008). Structural basis of transcription inhibition by alphaamanitin and implications for RNA polymerase II translocation. Nat Struct Mol Biol 15, 811-818.
- 24. Burmann, B.M., Knauer, S.H., Sevostyanova, A., Schweimer, K., Mooney, R.A., Landick, R., Artsimovitch, I., and Rosch, P. (2012). An alpha helix to beta barrel domain switch transforms the transcription factor RfaH into a translation factor. Cell 150, 291-303.
- 25. Burton, Z.F., Feig, M., Gong, X.Q., Zhang, C., Nedialkov, Y.A., and Xiong, Y. (2005). NTPdriven translocation and regulation of downstream template opening by multi-subunit RNA polymerases. Biochem Cell Biol *83*, 486-496.

- 26. Buttner, M.J., and Lewis, C.G. (1992). Construction and characterization of Streptomyces coelicolor A3(2) mutants that are multiply deficient in the nonessential hrd-encoded RNA polymerase sigma factors. Journal of bacteriology *174*, 5165-5167.
- 27. Camarero, J.A., Shekhtman, A., Campbell, E.A., Chlenov, M., Gruber, T.M., Bryant, D.A., Darst, S.A., Cowburn, D., and Muir, T.W. (2002). Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 8536-8541.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. Cell *104*, 901-912.
- Cardinale, C.J., Washburn, R.S., Tadigotla, V.R., Brown, L.M., Gottesman, M.E., and Nudler, E. (2008). Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in E. coli. Science *320*, 935-938.
- Carpousis, A.J., and Gralla, J.D. (1980). Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the lac UV5 promoter. Biochemistry 19, 3245-3253.
- 31. Carpousis, A.J., and Gralla, J.D. (1985). Interaction of RNA polymerase with lacUV5 promoter DNA during mRNA initiation and elongation. Footprinting, methylation, and rifampicinsensitivity changes accompanying transcription initiation. Journal of molecular biology 183, 165-177.
- 32. Carvalho, A.T., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J. (2011). The Catalytic Mechanism of RNA Polymerase II. Journal of chemical theory and computation *7*, 1177-1188.
- 33. Chan, C.L., and Landick, R. (1989). The Salmonella typhimurium his operon leader region contains an RNA hairpin-dependent transcription pause site. Mechanistic implications of the effect on pausing of altered RNA hairpins. The Journal of biological chemistry 264, 20796-20804.
- 34. Chan, C.L., and Landick, R. (1993). Dissection of the his leader pause site by base substitution reveals a multipartite signal that includes a pause RNA hairpin. Journal of molecular biology 233, 25-42.
- 35. Chan, C.L., Wang, D., and Landick, R. (1997). Multiple interactions stabilize a single paused transcription intermediate in which hairpin to 3' end spacing distinguishes pause and termination pathways. Journal of molecular biology *268*, 54-68.
- 36. Cheung, A.C., and Cramer, P. (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. Nature 471, 249-253.

- 37. Colland, F., Fujita, N., Ishihama, A., and Kolb, A. (2002). The interaction between sigmaS, the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of Escherichia coli RNA polymerase. Genes Cells 7, 233-247.
- Craig, J.E., Nobbs, A., and High, N.J. (2002). The extracytoplasmic sigma factor, final sigma(E), is required for intracellular survival of nontypeable Haemophilus influenzae in J774 macrophages. Infect Immun 70, 708-715.
- 39. D'Argenio, V., Petrillo, M., Pasanisi, D., Pagliarulo, C., Colicchio, R., Tala, A., de Biase, M.S., Zanfardino, M., Scolamiero, E., Pagliuca, C., *et al.* (2016). The complete 12 Mb genome and transcriptome of Nonomuraea gerenzanensis with new insights into its duplicated "magic" RNA polymerase. Scientific reports *6*, 18.
- 40. d'Aubenton Carafa, Y., Brody, E., and Thermes, C. (1990). Prediction of rho-independent Escherichia coli transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. J Mol Biol *216*, 835-858.
- Decker, K.B., and Hinton, D.M. (2013). Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. Annual review of microbiology 67, 113-139.
- 42. Deighan, P., Pukhrambam, C., Nickels, B.E., and Hochschild, A. (2011). Initial transcribed region sequences influence the composition and functional properties of the bacterial elongation complex. Genes & development 25, 77-88.
- 43. Devi, P.G., Campbell, E.A., Darst, S.A., and Nickels, B.E. (2010). Utilization of variably spaced promoter-like elements by the bacterial RNA polymerase holoenzyme during early elongation. Molecular microbiology *75*, 607-622.
- 44. Dombroski, A.J., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1993). Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. Genes & development *7*, 2446-2455.
- 45. Duchi, D., Bauer, D.L., Fernandez, L., Evans, G., Robb, N., Hwang, L.C., Gryte, K., Tomescu, A., Zawadzki, P., Morichaud, Z., *et al.* (2016). RNA Polymerase Pausing during Initial Transcription. Mol Cell *63*, 939-950.
- 46. Ederth, J., Artsimovitch, I., Isaksson, L.A., and Landick, R. (2002). The downstream DNA jaw of bacterial RNA polymerase facilitates both transcriptional initiation and pausing. J Biol Chem 277, 37456-37463.
- Ehara, H., Yokoyama, T., Shigematsu, H., Yokoyama, S., Shirouzu, M., and Sekine, S.I. (2017). Structure of the complete elongation complex of RNA polymerase II with basal factors. Science 357, 921-924.

- 48. Elias, A.F., Bono, J.L., Carroll, J.A., Stewart, P., Tilly, K., and Rosa, P. (2000). Altered stationary-phase response in a Borrelia burgdorferi rpoS mutant. Journal of bacteriology *182*, 2909-2918.
- 49. Epshtein, V., Cardinale, C.J., Ruckenstein, A.E., Borukhov, S., and Nudler, E. (2007). An allosteric path to transcription termination. Mol Cell 28, 991-1001.
- Epshtein, V., Mustaev, A., Markovtsov, V., Bereshchenko, O., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (2002). Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center. Mol Cell *10*, 623-634.
- 51. Esyunina, D., Klimuk, E., Severinov, K., and Kulbachinskiy, A. (2015). Distinct pathways of RNA polymerase regulation by a phage-encoded factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *112*, 2017-2022.
- 52. Feklistov, A., Barinova, N., Sevostyanova, A., Heyduk, E., Bass, I., Vvedenskaya, I., Kuznedelov, K., Merkiene, E., Stavrovskaya, E., Klimasauskas, S., *et al.* (2006). A basal promoter element recognized by free RNA polymerase sigma subunit determines promoter recognition by RNA polymerase holoenzyme. Mol Cell 23, 97-107.
- 53. Feklistov, A., and Darst, S.A. (2011). Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. Cell *147*, 1257-1269.
- 54. Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., and Gross, C.A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. Annual review of microbiology *68*, 357-376.
- 55. Fischer, M.G., Allen, M.J., Wilson, W.H., and Suttle, C.A. (2010). Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 19508-19513.
- 56. Foster, J.E., Holmes, S.F., and Erie, D.A. (2001). Allosteric binding of nucleoside triphosphates to RNA polymerase regulates transcription elongation. Cell *106*, 243-252.
- 57. Gaal, T., Rao, L., Estrem, S.T., Yang, J., Wartell, R.M., and Gourse, R.L. (1994). Localization of the intrinsically bent DNA region upstream of the E.coli rrnB P1 promoter. Nucleic acids research *22*, 2344-2350.
- 58. Gardner, J.F. (1982). Initiation, pausing, and termination of transcription in the threonine operon regulatory region of Escherichia coli. The Journal of biological chemistry 257, 3896-3904.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 A resolution. Science 292, 1876-1882.

- 60. Goldman, S.R., Nair, N.U., Wells, C.D., Nickels, B.E., and Hochschild, A. (2015). The primary sigma factor in Escherichia coli can access the transcription elongation complex from solution in vivo. Elife *4*, e10514
- Gong, X.Q., Zhang, C., Feig, M., and Burton, Z.F. (2005). Dynamic error correction and regulation of downstream bubble opening by human RNA polymerase II. Mol Cell 18, 461-470.
- 62. Gourse, R.L., Ross, W., and Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. Molecular microbiology *37*, 687-695.
- 63. Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63, 141-155.
- 64. Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annual review of microbiology *57*, 441-466.
- 65. Gusarov, I., and Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. Mol Cell *3*, 495-504.
- 66. Ha, K.S., Toulokhonov, I., Vassylyev, D.G., and Landick, R. (2010). The NusA N-terminal domain is necessary and sufficient for enhancement of transcriptional pausing via interaction with the RNA exit channel of RNA polymerase. Journal of molecular biology *401*, 708-725.
- 67. Haines, N.M., Kim, Y.I., Smith, A.J., and Savery, N.J. (2014). Stalled transcription complexes promote DNA repair at a distance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 4037-4042.
- 68. Han, K., Li, Z.F., Peng, R., Zhu, L.P., Zhou, T., Wang, L.G., Li, S.G., Zhang, X.B., Hu, W., Wu, Z.H., *et al.* (2013). Extraordinary expansion of a Sorangium cellulosum genome from an alkaline milieu. Scientific reports *3*, 2101.
- 69. Hatoum, A., and Roberts, J. (2008). Prevalence of RNA polymerase stalling at Escherichia coli promoters after open complex formation. Molecular microbiology *68*, 17-28.
- 70. Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., and Gourse, R.L. (2006). rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. Cell *125*, 1069-1082.
- 71. Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. Nat Rev Microbiol *6*, 507-519.
- 72. Hauser, C.A., Sharp, J.A., Hatfield, L.K., and Hatfield, G.W. (1985). Pausing of RNA polymerase during in vitro transcription through the ilvB and ilvGEDA attenuator regions of Escherichia coli K12. The Journal of biological chemistry 260, 1765-1770.

- 73. Hawley, D.K., and McClure, W.R. (1983). Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. Nucleic acids research *11*, 2237-2255.
- 74. Hein, P.P., Kolb, K.E., Windgassen, T., Bellecourt, M.J., Darst, S.A., Mooney, R.A., and Landick, R. (2014). RNA polymerase pausing and nascent-RNA structure formation are linked through clamp-domain movement. Nature structural & molecular biology 21, 794-802.
- 75. Hein, P.P., Palangat, M., and Landick, R. (2011). RNA transcript 3'-proximal sequence affects translocation bias of RNA polymerase. Biochemistry *50*, 7002-7014.
- 76. Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Advances in microbial physiology *46*, 47-110.
- 77. Herbert, K.M., La Porta, A., Wong, B.J., Mooney, R.A., Neuman, K.C., Landick, R., and Block, S.M. (2006). Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules. Cell 125, 1083-1094.
- 78. Hollands, K., Sevostiyanova, A., and Groisman, E.A. (2014). Unusually long-lived pause required for regulation of a Rho-dependent transcription terminator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, E1999-2007.
- 79. Holmes, S.F., and Erie, D.A. (2003). Downstream DNA sequence effects on transcription elongation. Allosteric binding of nucleoside triphosphates facilitates translocation via a ratchet motion. The Journal of biological chemistry *278*, 35597-35608.
- Howe, J.A., Wang, H., Fischmann, T.O., Balibar, C.J., Xiao, L., Galgoci, A.M., Malinverni, J.C., Mayhood, T., Villafania, A., Nahvi, A., *et al.* (2015). Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. Nature *526*, 672-677.
- 81. Hsu, L.M. (2008). Monitoring abortive initiation. Methods.
- 82. Hu, Y., Morichaud, Z., Perumal, A.S., Roquet-Baneres, F., and Brodolin, K. (2014). Mycobacterium RbpA cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding. Nucleic acids research 42, 10399-10408.
- 83. Imashimizu, M., Takahashi, H., Oshima, T., McIntosh, C., Bubunenko, M., Court, D.L., and Kashlev, M. (2015). Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo. Genome Biol 16, 98.
- Iyer, L.M., and Aravind, L. (2012). Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus. J Struct Biol 179, 299-319.
- 85. James, K., Gamba, P., Cockell, S.J., and Zenkin, N. (2017). Misincorporation by RNA polymerase is a major source of transcription pausing in vivo. Nucleic acids research 45, 1105-1113.
- 86. Jin, D.J., and Gross, C.A. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. J Mol Biol 202, 45-58.

- Jishage, M., and Ishihama, A. (1995). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. Journal of bacteriology 177, 6832-6835.
- 88. Jonkers, I., and Lis, J.T. (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. Nat Rev Mol Cell Biol *16*, 167-177.
- Kapanidis, A.N., Margeat, E., Ho, S.O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., and Ebright, R.H. (2006). Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism. Science 314, 1144-1147.
- 90. Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. Microbiol Mol Biol Rev *69*, 527-543.
- 91. Kireeva, M.L., Domecq, C., Coulombe, B., Burton, Z.F., and Kashlev, M. (2011). Interaction of RNA polymerase II fork loop 2 with downstream non-template DNA regulates transcription elongation. The Journal of biological chemistry 286, 30898-30910.
- 92. Kireeva, M.L., and Kashlev, M. (2009). Mechanism of sequence-specific pausing of bacterial RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 8900-8905.
- 93. Kireeva, M.L., Nedialkov, Y.A., Cremona, G.H., Purtov, Y.A., Lubkowska, L., Malagon, F., Burton, Z.F., Strathern, J.N., and Kashlev, M. (2008). Transient reversal of RNA polymerase II active site closing controls fidelity of transcription elongation. Mol Cell 30, 557-566.
- 94. Kireeva, M.L., Opron, K., Seibold, S.A., Domecq, C., Cukier, R.I., Coulombe, B., Kashlev, M., and Burton, Z.F. (2012). Molecular dynamics and mutational analysis of the catalytic and translocation cycle of RNA polymerase. BMC biophysics 5, 11.
- 95. Ko, D.C., Marr, M.T., Guo, J., and Roberts, J.W. (1998). A surface of Escherichia coli sigma 70 required for promoter function and antitermination by phage lambda Q protein. Genes & development *12*, 3276-3285.
- 96. Kolb, K.E., Hein, P.P., and Landick, R. (2014). Antisense oligonucleotide-stimulated transcriptional pausing reveals RNA exit channel specificity of RNA polymerase and mechanistic contributions of NusA and RfaH. The Journal of biological chemistry 289, 1151-1163.
- 97. Kolter, R., and Yanofsky, C. (1982). Attenuation in amino acid biosynthetic operons. Annual review of genetics *16*, 113-134.
- 98. Komissarova, N., Becker, J., Solter, S., Kireeva, M., and Kashlev, M. (2002). Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. Mol Cell 10, 1151-1162.

- 99. Komissarova, N., and Kashlev, M. (1997a). RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. The Journal of biological chemistry *272*, 15329-15338.
- 100.Komissarova, N., and Kashlev, M. (1997b). Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. Proc Natl Acad Sci USA *94*, 1755-1760.
- 101.Koo, B.M., Rhodius, V.A., Campbell, E.A., and Gross, C.A. (2009a). Dissection of recognition determinants of Escherichia coli sigma32 suggests a composite -10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element. Molecular microbiology 72, 815-829.
- 102.Koo, B.M., Rhodius, V.A., Nonaka, G., deHaseth, P.L., and Gross, C.A. (2009b). Reduced capacity of alternative sigmas to melt promoters ensures stringent promoter recognition. Genes & development 23, 2426-2436.
- 103.Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2000). A structural model of transcription elongation. Science 289, 619-625.
- 104.Krummel, B., and Chamberlin, M.J. (1989). RNA chain initiation by Escherichia coli RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. Biochemistry 28, 7829-7842.
- 105.Krummel, B., and Chamberlin, M.J. (1992). Structural analysis of ternary complexes of Escherichia coli RNA polymerase. Individual complexes halted along different transcription units have distinct and unexpected biochemical properties. Journal of molecular biology 225, 221-237.
- 106.Kulish, D., Lee, J., Lomakin, I., Nowicka, B., Das, A., Darst, S., Normet, K., and Borukhov, S. (2000). The functional role of basic patch, a structural element of Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB. The Journal of biological chemistry 275, 12789-12798.
- 107.Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- 108.Landick, R. (1997). RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. Cell 88, 741-744.
- 109.Landick, R. (2005). NTP-entry routes in multi-subunit RNA polymerases. Trends in biochemical sciences 30, 651-654.
- 110.Landick, R. (2006). The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. Biochemical Society transactions *34*, 1062-1066.
- 111.Landick, R., Carey, J., and Yanofsky, C. (1985). Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the trp operon leader region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 4663-4667.

- 112.Landick, R., Colwell, A., and Stewart, J. (1990). Insertional mutagenesis of a plasmid-borne Escherichia coli rpoB gene reveals alterations that inhibit beta-subunit assembly into RNA polymerase. Journal of bacteriology *172*, 2844-2854.
- 113.Landick, R., Wang, D., and Chan, C.L. (1996). Quantitative analysis of transcriptional pausing by Escherichia coli RNA polymerase: his leader pause site as paradigm. Methods in enzymology 274, 334-353.
- 114.Lane, W.J., and Darst, S.A. (2010a). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. J Mol Biol *395*, 671-685.
- 115.Lane, W.J., and Darst, S.A. (2010b). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. Journal of molecular biology *395*, 686-704.
- 116.Larson, M.H., Greenleaf, W.J., Landick, R., and Block, S.M. (2008). Applied force reveals mechanistic and energetic details of transcription termination. Cell *132*, 971-982.
- 117.Larson, M.H., Mooney, R.A., Peters, J.M., Windgassen, T., Nayak, D., Gross, C.A., Block, S.M., Greenleaf, W.J., Landick, R., and Weissman, J.S. (2014). A pause sequence enriched at translation start sites drives transcription dynamics in vivo. Science 344, 1042-1047.
- 118.Lavysh, D., Sokolova, M., Slashcheva, M., Forstner, K.U., and Severinov, K. (2017). Transcription Profiling of Bacillus subtilis Cells Infected with AR9, a Giant Phage Encoding Two Multisubunit RNA Polymerases. mBio 8, 02041-16.
- 119.Leeds, J.A., and Welch, R.A. (1997). Enhancing transcription through the Escherichia coli hemolysin operon, hlyCABD: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. Journal of bacteriology *179*, 3519-3527.
- 120.Leela, J.K., Syeda, A.H., Anupama, K., and Gowrishankar, J. (2013). Rho-dependent transcription termination is essential to prevent excessive genome-wide R-loops in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 258-263.
- 121.Liere, K., Weihe, A., and Borner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. Journal of plant physiology *168*, 1345-1360.
- 122.Lisser, S., and Margalit, H. (1993). Compilation of E. coli mRNA promoter sequences. Nucleic acids research 21, 1507-1516.
- 123.Liu, B., Zuo, Y., and Steitz, T.A. (2016). Structures of E. coli sigmaS-transcription initiation complexes provide new insights into polymerase mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- 124.Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. Journal of bacteriology *174*, 3843-3849.

- 125.Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., and Buttner, M.J. (1994). Analysis of the Streptomyces coelicolor sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 7573-7577.
- 126.Lubkowska, L., Maharjan, A.S., and Komissarova, N. (2011). RNA folding in transcription elongation complex: implication for transcription termination. The Journal of biological chemistry *286*, 31576-31585.
- 127.Maas, W.K., and McFall, E. (1964). Genetic Aspects of Metabolic Control. Annual review of microbiology *18*, 95-110.
- 128.Maciag, A., Peano, C., Pietrelli, A., Egli, T., De Bellis, G., and Landini, P. (2011). In vitro transcription profiling of the sigmaS subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the sigmaS regulon and identification of sigmaS-specific promoter sequence elements. Nucleic acids research 39, 5338-5355.
- 129.Maeda, H., Fujita, N., and Ishihama, A. (2000). Competition among seven Escherichia coli sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. Nucleic acids research 28, 3497-3503.
- 130.Maizels, N.M. (1973). The nucleotide sequence of the lactose messenger ribonucleic acid transcribed from the UV5 promoter mutant of Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *70*, 3585-3589.
- 131.Manganelli, R., Fattorini, L., Tan, D., Iona, E., Orefici, G., Altavilla, G., Cusatelli, P., and Smith, I. (2004). The extra cytoplasmic function sigma factor sigma(E) is essential for Mycobacterium tuberculosis virulence in mice. Infect Immun 72, 3038-3041.
- 132.Mani, N., and Dupuy, B. (2001). Regulation of toxin synthesis in Clostridium difficile by an alternative RNA polymerase sigma factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 5844-5849.
- 133.Marr, M.T., Datwyler, S.A., Meares, C.F., and Roberts, J.W. (2001). Restructuring of an RNA polymerase holoenzyme elongation complex by lambdoid phage Q proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 8972-8978.
- 134.Marr, M.T., and Roberts, J.W. (2000). Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. Mol Cell *6*, 1275-1285.
- 135.Martin, F.H., and Tinoco, I., Jr. (1980). DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. Nucleic acids research *8*, 2295-2299.
- 136.Martinez-Rucobo, F.W., and Cramer, P. (2013). Structural basis of transcription elongation. Biochimica et biophysica acta 1829, 9-19.

- 137.Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A.N., Niu, W., Ebright, Y.W., Levy, R., and Ebright, R.H. (2002). Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. Cell *108*, 599-614.
- 138.Membrillo-Hernandez, J., and Lin, E.C. (1999). Regulation of expression of the adhE gene, encoding ethanol oxidoreductase in Escherichia coli: transcription from a downstream promoter and regulation by fnr and RpoS. Journal of bacteriology *181*, 7571-7579.
- 139.Mikulskis, A., Aristarkhov, A., and Lin, E.C. (1997). Regulation of expression of the ethanol dehydrogenase gene (adhE) in Escherichia coli by catabolite repressor activator protein Cra. Journal of bacteriology 179, 7129-7134.
- 140.Miropolskaya, N., Artsimovitch, I., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., and Kulbachinskiy, A. (2009). Allosteric control of catalysis by the F loop of RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 18942-18947.
- 141.Miropolskaya, N., Esyunina, D., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., Artsimovitch, I., and Kulbachinskiy, A. (2014). Interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis. Nucleic acids research *42*, 544-552.
- 142.Mitchell, J.E., Zheng, D., Busby, S.J., and Minchin, S.D. (2003). Identification and analysis of 'extended -10' promoters in Escherichia coli. Nucleic acids research *31*, 4689-4695.
- 143.Mukhamedyarov, D., Makarova, K.S., Severinov, K., and Kuznedelov, K. (2011). Francisella RNA polymerase contains a heterodimer of non-identical alpha subunits. BMC molecular biology 12, 50.
- 144.Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A.N., Mekler, V., Kortkhonjia, E., Ebright, Y.W., and Ebright, R.H. (2001). Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. Cell *106*, 453-463.
- 145.Murakami, K.S. (2013). X-ray crystal structure of Escherichia coli RNA polymerase sigma70 holoenzyme. The Journal of biological chemistry *288*, 9126-9134.
- 146.Murakami, K.S., and Darst, S.A. (2003). Bacterial RNA polymerases: the wholo story. Curr Opin Struct Biol *13*, 31-39.
- 147.Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., and Darst, S.A. (2002a). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. Science 296, 1285-1290.
- 148.Murakami, K.S., Masuda, S., and Darst, S.A. (2002b). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 A resolution. Science *296*, 1280-1284.

- 149.Nayak, D., Voss, M., Windgassen, T., Mooney, R.A., and Landick, R. (2013). Cys-pair reporters detect a constrained trigger loop in a paused RNA polymerase. Mol Cell *50*, 882-893.
- 150.Nechaev, S., Chlenov, M., and Severinov, K. (2000). Dissection of two hallmarks of the open promoter complex by mutation in an RNA polymerase core subunit. J Biol Chem 275, 25516-25522.
- 151.Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., and Altuvia, S. (2014). Changes in transcriptional pausing modify the folding dynamics of the pH-responsive RNA element. Nucleic acids research *42*, 622-630.
- 152.Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., Sheaffer, A., Westhof, E., and Altuvia, S. (2009). A pH-responsive riboregulator. Genes & development *23*, 2650-2662.
- 153.Nedialkov, Y.A., Gong, X.Q., Hovde, S.L., Yamaguchi, Y., Handa, H., Geiger, J.H., Yan, H., and Burton, Z.F. (2003). NTP-driven translocation by human RNA polymerase II. The Journal of biological chemistry *278*, 18303-18312.
- 154.Nickels, B.E., Mukhopadhyay, J., Garrity, S.J., Ebright, R.H., and Hochschild, A. (2004). The sigma 70 subunit of RNA polymerase mediates a promoter-proximal pause at the lac promoter. Nature structural & molecular biology *11*, 544-550.
- 155.Nickels, B.E., Roberts, C.W., Sun, H., Roberts, J.W., and Hochschild, A. (2002). The sigma(70) subunit of RNA polymerase is contacted by the (lambda)Q antiterminator during early elongation. Mol Cell *10*, 611-622.
- 156.Nudler, E. (2009). RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. Annual review of biochemistry 78, 335-361.
- 157.Nudler, E. (2012). RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability. Cell *149*, 1438-1445.
- 158.Nudler, E., Goldfarb, A., and Kashlev, M. (1994). Discontinuous mechanism of transcription elongation. Science *265*, 793-796.
- 159.Nudler, E., and Mironov, A.S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. Trends in biochemical sciences *29*, 11-17.
- 160.Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., and Goldfarb, A. (1997). The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. Cell 89, 33-41.
- 161.Orlova, M., Newlands, J., Das, A., Goldfarb, A., and Borukhov, S. (1995). Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA *92*, 4596-4600.
- 162.Osanai, T., Ikeuchi, M., and Tanaka, K. (2008). Group 2 sigma factors in cyanobacteria. Physiologia plantarum 133, 490-506.

- 163.Paget, M.S. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. Biomolecules 5, 1245-1265.
- 164.Perdrizet, G.A., 2nd, Artsimovitch, I., Furman, R., Sosnick, T.R., and Pan, T. (2012). Transcriptional pausing coordinates folding of the aptamer domain and the expression platform of a riboswitch. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 3323-3328.
- 165.Perdue, S.A., and Roberts, J.W. (2011). sigma(70)-dependent Transcription Pausing in Escherichia coli. Journal of molecular biology *412*, 782-792.
- 166.Peters, J.M., Vangeloff, A.D., and Landick, R. (2011). Bacterial Transcription Terminators: The RNA 3'-End Chronicles. Journal of molecular biology *412*, 793-813.
- 167.Petushkov, I., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017). sigma38-dependent promoterproximal pausing by bacterial RNA polymerase. Nucleic acids research *45*, 3006-3016.
- 168.Petushkov, I., Pupov, D., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2015). Mutations in the CRE pocket of bacterial RNA polymerase affect multiple steps of transcription. Nucleic acids research 43, 5798-5809.
- 169.Pietsch, F., Bergman, J.M., Brandis, G., Marcusson, L.L., Zorzet, A., Huseby, D.L., and Hughes, D. (2017). Ciprofloxacin selects for RNA polymerase mutations with pleiotropic antibiotic resistance effects. The Journal of antimicrobial chemotherapy 72, 75-84.
- 170.Proshkin, S., Rahmouni, A.R., Mironov, A., and Nudler, E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. Science *328*, 504-508.
- 171.Pupov, D., Kuzin, I., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2014). Distinct functions of the RNA polymerase sigma subunit region 3.2 in RNA priming and promoter escape. Nucleic acids research *42*, 4494-4504.
- 172.Raffaelle, M., Kanin, E.I., Vogt, J., Burgess, R.R., and Ansari, A.Z. (2005). Holoenzyme switching and stochastic release of sigma factors from RNA polymerase in vivo. Mol Cell 20, 357-366.
- 173.Ray-Soni, A., Bellecourt, M.J., and Landick, R. (2016). Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End. Annual review of biochemistry 85, 319-347.
- 174.Rees, W.A., Weitzel, S.E., Das, A., and von Hippel, P.H. (1997). Regulation of the elongationtermination decision at intrinsic terminators by antitermination protein N of phage lambda. Journal of molecular biology 273, 797-813.
- 175.Revyakin, A., Liu, C., Ebright, R.H., and Strick, T.R. (2006). Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. Science *314*, 1139-1143.

- 176.Rhodius, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006). Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. PLoS biology *4*, e2.
- 177.Ring, B.Z., Yarnell, W.S., and Roberts, J.W. (1996). Function of E. coli RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing. Cell *86*, 485-493.
- 178.Roberts, C.W., and Roberts, J.W. (1996). Base-specific recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. Cell *86*, 495-501.
- 179. Roberts, J.W. (1969). Termination factor for RNA synthesis. Nature 224, 1168-1174.
- 180.Roberts, J.W., Yarnell, W., Bartlett, E., Guo, J., Marr, M., Ko, D.C., Sun, H., and Roberts, C.W. (1998). Antitermination by bacteriophage lambda Q protein. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63, 319-325.
- 181.Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R.L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. Science 262, 1407-1413.
- 182.Ruff, E.F., Record, M.T., Jr., and Artsimovitch, I. (2015). Initial events in bacterial transcription initiation. Biomolecules *5*, 1035-1062.
- 183.Saecker, R.M., Record, M.T., Jr., and Dehaseth, P.L. (2011). Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiationcompetent open complexes, and initiation of RNA synthesis. Journal of molecular biology 412, 754-771.
- 184.Salgado, H., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Santos-Zavaleta, A., Muniz-Rascado, L., Garcia-Sotelo, J.S., Weiss, V., Solano-Lira, H., Martinez-Flores, I., Medina-Rivera, A., *et al.* (2013). RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, crossvalidated gold standards and more. Nucleic acids research *41*, D203-213.
- 185.Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989). Molecular cloning: Cold spring harbor press.
- 186.Santangelo, T.J., and Artsimovitch, I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. Nat Rev Microbiol *9*, 319-329.
- 187.Santangelo, T.J., and Roberts, J.W. (2004). Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. Mol Cell *14*, 117-126.
- 188.Sekine, S., Murayama, Y., Svetlov, V., Nudler, E., and Yokoyama, S. (2015). The ratcheted and ratchetable structural states of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions. Mol Cell 57, 408-421.
- 189.Selby, C.P., and Sancar, A. (1993). Molecular mechanism of transcription-repair coupling. Science 260, 53-58.

- 190.Sevostyanova, A., Svetlov, V., Vassylyev, D.G., and Artsimovitch, I. (2008). The elongation factor RfaH and the initiation factor sigma bind to the same site on the transcription elongation complex. Proc Natl Acad Sci USA *105*, 865-870.
- 191.Shao, W., and Zeitlinger, J. (2017). Paused RNA polymerase II inhibits new transcriptional initiation. Nat Genet, doi: 10.1038/ng.3867.
- 192.Shultzaberger, R.K., Chen, Z., Lewis, K.A., and Schneider, T.D. (2007). Anatomy of Escherichia coli sigma70 promoters. Nucleic acids research *35*, 771-788.
- 193.Sidorenkov, I., Komissarova, N., and Kashlev, M. (1998). Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. Mol Cell *2*, 55-64.
- 194.Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1989). Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J Mol Biol 206, 591-603.
- 195.Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (2003). Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. EMBO J 22, 2234-2244.
- 196.Sosunova, E., Sosunov, V., Kozlov, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A., and Mustaev, A. (2003). Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre. Proc Natl Acad Sci USA *100*, 15469-15474.
- 197.Staron, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., and Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. Molecular microbiology *74*, 557-581.
- 198.Steiner, S., Schroter, Y., Pfalz, J., and Pfannschmidt, T. (2011). Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. Plant physiology *157*, 1043-1055.
- 199.Steitz, T.A. (1998). A mechanism for all polymerases. Nature 391, 231-232.
- 200.Straney, D.C., and Crothers, D.M. (1985). Intermediates in transcription initiation from the E. coli lac UV5 promoter. Cell *43*, 449-459.
- 201.Strobel, E.J., and Roberts, J.W. (2014). Regulation of promoter-proximal transcription elongation: enhanced DNA scrunching drives lambdaQ antiterminator-dependent escape from a sigma70-dependent pause. Nucleic acids research *42*, 5097-5108.
- 202.Strobel, E.J., and Roberts, J.W. (2015). Two transcription pause elements underlie a sigma70dependent pause cycle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *112*, E4374-4380.

- 203.Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., and Sasaki, M. (1995). Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. Biochemistry 34, 11211-11216.
- 204.Svetlov, V., and Nudler, E. (2013). Basic mechanism of transcription by RNA polymerase II. Biochim Biophys Acta *1829*, 20-28.
- 205.Toulokhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., and Landick, R. (2007). A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. Mol Cell 27, 406-419.
- 206.Vassylyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 A resolution. Nature *417*, 712-719.
- 207.Vassylyev, D.G., Vassylyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H., and Artsimovitch, I. (2007a). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. Nature *448*, 157-162.
- 208.Vassylyev, D.G., Vassylyeva, M.N., Zhang, J., Palangat, M., Artsimovitch, I., and Landick, R. (2007b). Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. Nature 448, 163-168.
- 209.Vvedenskaya, I.O., Vahedian-Movahed, H., Bird, J.G., Knoblauch, J.G., Goldman, S.R., Zhang, Y., Ebright, R.H., and Nickels, B.E. (2014). Transcription. Interactions between RNA polymerase and the "core recognition element" counteract pausing. Science *344*, 1285-1289.
- 210.Vvedenskaya, I.O., Vahedian-Movahed, H., Zhang, Y., Taylor, D.M., Ebright, R.H., and Nickels, B.E. (2016). Interactions between RNA polymerase and the core recognition element are a determinant of transcription start site selection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *113*, E2899-2905.
- 211.Wang, D., Bushnell, D.A., Huang, X., Westover, K.D., Levitt, M., and Kornberg, R.D. (2009). Structural basis of transcription: backtracked RNA polymerase II at 3.4 angstrom resolution. Science 324, 1203-1206.
- 212.Weixlbaumer, A., Leon, K., Landick, R., and Darst, S.A. (2013). Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. Cell *152*, 431-441.
- 213.Werner, F. (2012). A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life. Journal of molecular biology *417*, 13-27.
- 214.Westover, K.D., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. Cell *119*, 481-489.
- 215.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.

- 216.Wilson, K.S., and von Hippel, P.H. (1994). Stability of *Escherichia coli* transcription complexes near an intrinsic terminator. J Mol Biol 244, 36-51.
- 217.Winkelman, J.T., Chandrangsu, P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2016a). Open complex scrunching before nucleotide addition accounts for the unusual transcription start site of E. coli ribosomal RNA promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *113*, E1787-1795.
- 218. Winkelman, J.T., and Gourse, R.L. (2017). Open complex DNA scrunching: A key to transcription start site selection and promoter escape. Bioessays *39*, doi: 10.1002/bies.201600193.
- 219.Winkelman, J.T., Vvedenskaya, I.O., Zhang, Y., Zhang, Y., Bird, J.G., Taylor, D.M., Gourse, R.L., Ebright, R.H., and Nickels, B.E. (2016b). Multiplexed protein-DNA cross-linking: Scrunching in transcription start site selection. Science 351, 1090-1093.
- 220.Winkler, M.E., and Yanofsky, C. (1981). Pausing of RNA polymerase during in vitro transcription of the tryptophan operon leader region. Biochemistry *20*, 3738-3744.
- 221.Wojtas, M., Peralta, B., Ondiviela, M., Mogni, M., Bell, S.D., and Abrescia, N.G. (2011). Archaeal RNA polymerase: the influence of the protruding stalk in crystal packing and preliminary biophysical analysis of the Rpo13 subunit. Biochemical Society transactions 39, 25-30.
- 222.Yakunina, M., Artamonova, T., Borukhov, S., Makarova, K.S., Severinov, K., and Minakhin,
 L. (2015). A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage.
 Nucleic acids research 43, 10411-10420.
- 223.Yarnell, W.S., and Roberts, J.W. (1999). Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. Science 284, 611-615.
- 224.Young, B.A., Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2002). Views of transcription initiation. Cell 109, 417-420.
- 225.Yuzenkova, Y., Tadigotla, V.R., Severinov, K., and Zenkin, N. (2011). A new basal promoter element recognized by RNA polymerase core enzyme. Embo J *30*, 3766-3775.
- 226.Zakharova, N., Paster, B.J., Wesley, I., Dewhirst, F.E., Berg, D.E., and Severinov, K.V. (1999). Fused and overlapping rpoB and rpoC genes in Helicobacters, Campylobacters, and related bacteria. Journal of bacteriology *181*, 3857-3859.
- 227.Zenkin, N., Kulbachinskiy, A., Yuzenkova, Y., Mustaev, A., Bass, I., Severinov, K., and Brodolin, K. (2007). Region 1.2 of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the -10 promoter element. EMBO J 26, 955-964.
- 228.Zenkin, N., Yuzenkova, Y., and Severinov, K. (2006). Transcript-assisted transcriptional proofreading. Science *313*, 518-520.

- 229.Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. (1999).
 Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 A resolution. Cell *98*, 811-824.
- 230.Zhang, J., and Landick, R. (2016). A Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. Trends in biochemical sciences *41*, 293-310.
- 231.Zhang, J., Palangat, M., and Landick, R. (2010). Role of the RNA polymerase trigger loop in catalysis and pausing. Nature structural & molecular biology *17*, 99-104.
- 232.Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M.X., Arnold, E., and Ebright, R.H. (2012). Structural basis of transcription initiation. Science *338*, 1076-1080.
- 233.Zhilina, E., Esyunina, D., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2012). Structural transitions in the transcription elongation complexes of bacterial RNA polymerase during sigma-dependent pausing. Nucleic acids research *40*, 3078-3091.
- 234.Zhilina, E., Miropolskaya, N., Bass, I., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2011).
 Characteristics of sigma-dependent pausing in RNA polymerases from *E. coli* and *T. aquaticus*.
 Biochemistry (Mosc) 76, 1348-1358.
- 235.Zuo, Y., and Steitz, T.A. (2015). Crystal Structures of the E. coli Transcription Initiation Complexes with a Complete Bubble. Mol Cell *58*, 534-540.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Название	Последовательность 5'-3'
T7A1 LRI	AGTGAATTCTATTTGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAG
T7A1 HindIII	CGAAGCTTCCCCGGTGTCGATTGGGATGGCTATTCGCCGTGTCCC
T7A1+2G	GAAAATTTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAGGATACTTACAGCCAGC
	GAATAG
rrnBP1_IRI	GGAATTCCGCGGTCAGAAAATTATTTTAAATTTCCTC
rrnBP1_rHIII	CCCGAAGCTTGGCGTGAAAGCCGTTCCGTGTCA
rrnBP1-7G	TTATTTTAAATTTCCTCTTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGGGCCACCACTGACACGGAACAACGGC
rrnBP1-7G+2G	TTATTTTAAATTTCCTCTTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGGGCCACCAGTGACACGGAACAACGGC
λPR-left	CGTTAAATCTATCACCGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGCGTG
HisP WT	CACTGGAAGATCTGAATGTCTTCCAGCACACATCG
HisP+1C	CACTGGAAGATCTGAATGTCTTCGAGCACACATCG
HisP+2C	CACTGGAAGATCTGAATGTCTTGCAGCACACATCG
adhEp1_frw	CTAACTACTTAAAATTGCTATCATTCG
adhEp1_rev	CAAAGCTGACACCTTTCAGCATCG
adhEp1+11G_rev	CAAAGCTGACACCTTTCAGCATCGCTTTTCGCCATTACAGCTAACAG
ecnB_frw	TCCATCTCTCGCGCTGCCAGCTAATTTTTC
ecnB_rev	CTTCCTTTTAGGTAATGTTATTTATG
ecnB+5G_rev	TCTTCCTTTTAGGTAATGTTATTTATGTTTGCCTACAGCAAATTAATAATAG
adhEp1lux_frw	GGATGAATTCCCGGATAATGTTAGCCATAAATAAGG
adhEp1luxWT_rev	GGATGGATCCAATTTTTGCAAAGCTGACACCTTTCAG
adhEp1lu+11G_rev	GGATGGATCCAATTTTTGCAAAGCTGACACCTTTCAGCATCGCTTTTCGCCATTACAGCTAACAG
T5N25Cons-left	TCTTTGCGCTAAAATTTTTTTAAAAGTAT
T5N25Univ-right	GAGAGAGGAGTTTAAATATGGCTGGTT
T5N25Cons-7mer	TTTTTTTAAAAGTATTTGACATCAGGAAAATTTTTTGGTATAATAGATTCATAAATCTGAGAGAGGAGTTT
rpoB_Cla-frw	GAAAAAGCTCATCGATATCCG
EBdel533546_3G_MfeI	GTTTCAATTGGACATACGCGACCGTAGTGAGTCGGGTGTACGTCTCGAACTCCTCCTGCGGAGATACGACGT
_r	TTGTGCGTAATC

ErpoS_38_NdeI_d	GATCATCATATGAGTCAGAATACGCTGAAAGTTC
sigmaS_L117F_rev	CGATAAGGTCAAACAACGCCAGAC
ribo_hisP_17	UCAUCCGGCGAUGUGUG
t_hisP_WT	CCACTGGAAGATCTGAATTCTCTTCCAGCACACATCAGGACGTACTGACC
nt_hisP_WT	GGTCAGTACGTCCTGTCGATCTTCGGAAGAGAAATTCAGATCTTCCAGTGG
ribo_antisense_hisP	CCGGAUGA
RNA_20_pause	AUCACGAUAAAUGAGCGGAU
t_60	GGGCAATCAGCTGTTTCCTGTGTGAACATGCGATCCGCTCATTATAGCACTAAGTATCCT
nt_60	AGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATCGCATGTTCACACAGGAAACAGCTGATTGCCC
t_60-10M	GGGCAATCAGCTGTTTCCTGTGTGAACATGCGATCCGCTCATTCGAGCACTAAGTATCCT
nt_60-10M	AGGATACTTAGTGCTCGAATGAGCGGATCGCATGTTCACACAGGAAACAGCTGATTGCCC
t_60-TG	GGGCAATCAGCTGTTTCCTGTGTGAACATGCGATCCGCTCATTATAG <i>TG</i> CTAAGTATCCT
nt_60-TG	AGGATACTTAGCACTATAATGAGCGGATCGCATGTTCACACAGGAAACAGCTGATTGCCC
RNA_adhEp1	AUCACGAUAAAUGGCGAAAA
adhEp1_t	GGGCTTGCAAAGCTGACACCTTTCAGCATCGCTTTTCGCCATTATAGCTAACAGTTACCG
adhEp1_nt	CGGTAACTGTTAGCTATAATGGCGAAAAGCGATGCTGAAAGGTGTCAGCTTTGCAAGCCC