

*На правах рукописи*

**ПРОШКИН Сергей Александрович**

**МЕХАНИЗМЫ КООРДИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ С  
ТРАНСЛЯЦИЕЙ И РЕПАРАЦИЕЙ ДНК У *ESCHERICHIA COLI***

03.01.03 - Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА – 2014

Работа выполнена в лаборатории биохимической генетики Федерального государственного унитарного предприятия “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” (ФГУП “ГосНИИГенетика”).

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
ФГУП “ГосНИИГенетика”

Миронов Александр Сергеевич

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт белка  
Российской академии наук

Колб Вячеслав Адамович

доктор биологических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Патрушев Лев Иванович

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Защита состоится 2014 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов”.

Автореферат разослан 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат химических наук, доцент

Т.Л. Воюшина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой, - ключевой этап экспрессии генов и клеточной регуляции. Элонгационный комплекс, включающий РНК-полимеразу, матрицу ДНК и синтезируемую РНК, – центральный интермедиат в транскрипционном цикле, который служит конечной мишенью для различных регуляторных белковых факторов и сигналов, закодированных в ДНК и/или РНК (Прошкин С.А. и Миронов А.С., 2010). Взаимодействие элонгационного комплекса РНК-полимеразы с компонентами других клеточных процессов (трансляции, репликации или репарации ДНК) позволяет координировать транскрипцию с последующими этапами генной экспрессии, лежит в основе поддержания стабильности генома и сопряжения транскрипции с репарацией ДНК (Nudler E., 2012). Изучение механизмов, определяющих взаимосвязь этих важнейших молекулярных машин, – актуальная фундаментальная проблема, на решение которой было направлено диссертационное исследование.

Транскрипция и трансляция у бактерий сопряжены в пространстве и во времени. Инициация трансляции большинства бактериальных мРНК начинается вскоре после экспонирования рибосом-связывающего участка (RBS) РНК на выходе из РНК-связывающего канала РНК-полимеразы. Хотя о связи транскрипции и трансляции в бактериях известно уже несколько десятилетий, механизм, лежащий в основе координации этих процессов, был описан лишь для специфических случаев полярного эффекта и аттенюации транскрипции (Richardson, 1991; Yanofsky, 1981). В каждом из этих феноменов эффект рибосомы на РНК-полимеразу опосредован или фактором Rho, или специфической вторичной структурой РНК. В данной работе мы обнаружили, что транслирующая рибосома напрямую assisteрует РНК-полимеразе в ходе элонгации транскрипции (Proshkin et al., 2010).

Клеточные РНК-полимеразы очень чувствительны к отклонениям в структуре матричной цепи ДНК, и в случае повреждения ДНК транскрипция на этом месте временно или постоянно блокируется (Selby and Sancar, 1990; Tornaletti, 2005). Таким образом, РНК-полимераза может служить сенсором, осуществляющим контроль качества ДНК во время транскрипции. Скорость репарации нуклеотидов активно транскрибируемых генов обычно выше, чем нетранскрибируемых участков генома, причем матричная цепь ДНК исправляется быстрее нематричной (Mellon and Hanawalt, 1989). Это явление получило название репарации, сопряженной с транскрипцией (transcription-coupled repair, TCR), и описано как путь глобальной эксцизионной репарации нуклеотидов у бактерий и у эукариот (Gaillard and

Aguilera, 2013; Ganesan et al., 2012). В ходе транскрипции РНК-полимераза останавливается на поврежденных участках ДНК. Для исправления повреждения ДНК к соответствующему участку необходим доступ белков системы репарации, поэтому остановленная РНК-полимераза должна быть удалена с матрицы (терминация транскрипции) или отодвинута в сторону от повреждения. Известная на сегодняшний день модель сопряженной с транскрипцией репарации ДНК у бактерий основана на участии фактора Mfd, терминирующего транскрипцию. Мы обнаружили, что хеликаза UvrD может быть ключевым компонентом альтернативного пути сопряжения транскрипции с репарацией ДНК (Epshtein et al., 2014).

### **Цели и задачи работы**

Целью настоящей работы являлось выяснение механизмов взаимосвязи транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у *Escherichia coli*. В ходе работы решались следующие задачи: определение скорости транскрипции и трансляции в зависимости от генотипа и условий роста клеток; установление влияния транслирующей рибосомы *in vivo* на структурные изменения элонгационного комплекса РНК-полимеразы и эффективность преодоления им белковых препятствий на ДНК-матрице; определение эффектов белков Mfd и UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*; изучение с использованием генетических подходов влияния различных элонгационных факторов на сопряжение транскрипции с репарацией ДНК.

### **Научная новизна и практическая значимость**

Впервые показано, что лидирующая рибосома препятствует спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы в ходе транскрипции *in vivo* и облегчает прохождение РНК-полимеразой участков ДНК, связанных с белками. Функциональное взаимодействие между двумя молекулярными машинами у бактерий позволяет подстраивать транскрипцию к трансляционным потребностям на разных генах в разных условиях роста клетки.

Кроме того, впервые обнаружено, что в основе координации транскрипции с репарацией ДНК лежит UvrD-зависимое возвратное смещение элонгационного комплекса РНК-полимеразы, которое необходимо для экспонирования поврежденной ДНК белкам систем репарации. Наличие гомологов UvrD у эукариот, может свидетельствовать о существовании схожего механизма и у высших организмов.

Примененные в работе подходы могут быть использованы для изучения эффекта других факторов на элонгацию транскрипции. Результаты исследования имеют фундаментальное значение для понимания механизмов реализации и сохранения генетической информации. Практическая значимость заключается в создании основы для

разработки новых антибиотиков и стратегии конструирования бактериальных штаммов для суперпродукции важных биологически активных компонентов.

#### **Положения, выносимые на защиту**

Предложены новые молекулярные механизмы координации транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у бактерий.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на 38-м конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) “Механизмы в биологии” (Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.) и XXV Международной зимней молодежной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, посвященной 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН (Москва, 11-15 февраля 2013 г.).

Диссертационная работа была апробирована на совместном заседании секций «Генетика микроорганизмов» и «Молекулярная биология» Ученого Совета ФГУП “ГосНИИГенетика” 28 ноября 2013г.

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 5 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и содержит 30 рисунков и 3 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 211 работ.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

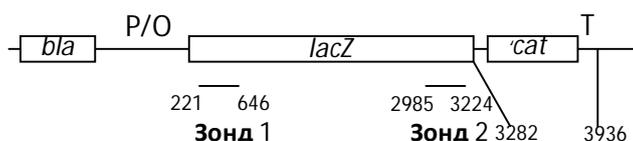
### **1. Координация транскрипции и трансляции**

#### **1.1. Скорость транскрипции и трансляции *in vivo* в различных условиях роста клеток**

Для выяснения, не может ли рибосома непосредственно влиять на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* и определять ход транскрипции, мы изменяли скорость трансляции, направленно воздействуя на рибосому, и проверили, как это отразится на скорости транскрипции.

Для измерения скорости элонгации транскрипции *in vivo* мы использовали плазмиду pUV12 с репортерным геном *LacZ* под контролем IPTG-индуцибельной версии промотора A1 фага T7 (Vogel and Jensen, 1994) (рис. 1). Среднюю скорость элонгации определяли по

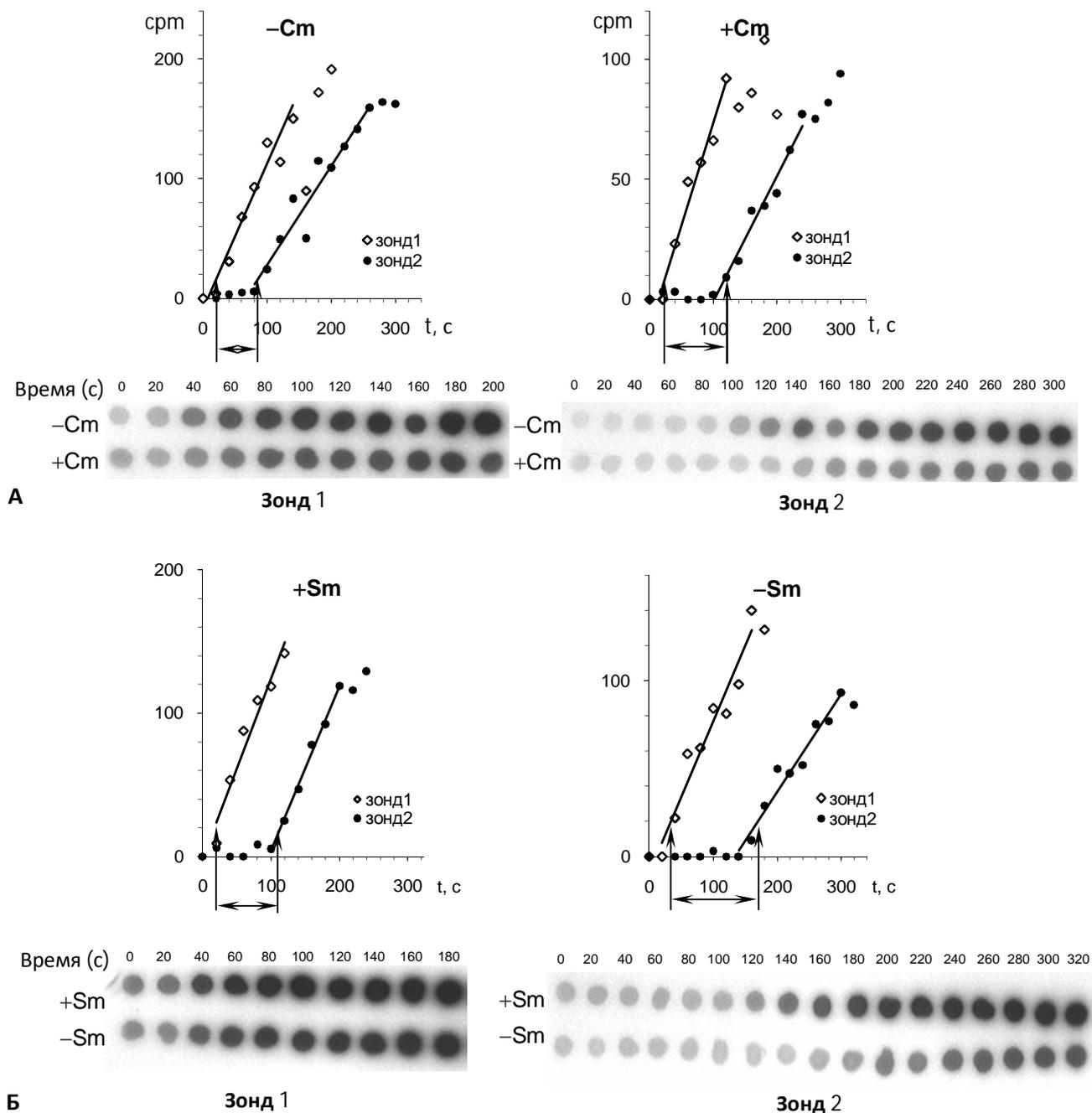
разнице во времени появления сигнала гибридизации со специфических зондов, комплементарных проксимальной и дистальной частям гена *LacZ*. Хотя абсолютные значения сигналов гибридизации могут меняться в зависимости от разных факторов (Rho-зависимая терминация, стабильность РНК или скорость инициации транскрипции), время между линейным приращением сигнала от двух зондов зависит только от скорости движения РНК-полимеразы (Epshtein et al., 2003; Vogel and Jensen, 1994) (рис. 2). Мы также определили скорость элонгации трансляции по времени, необходимом для синтеза первых активных мономеров  $\beta$ -галактозидазы (Bohman et al., 1984) (рис. 3).



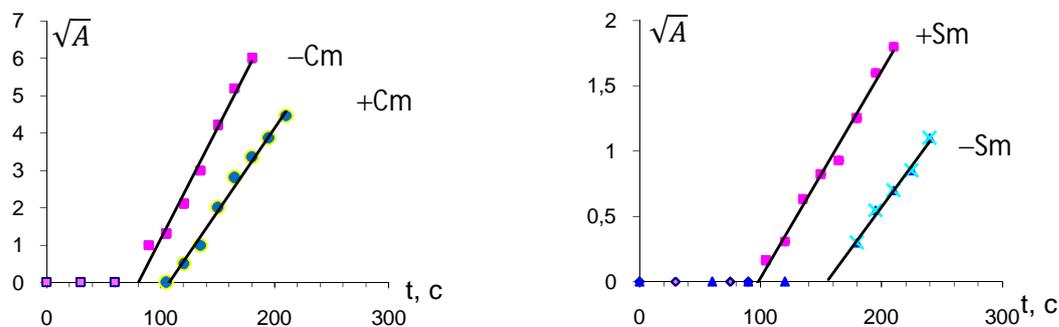
**Рисунок 1.** Схема фрагмента плазмиды pUV12. Прямоугольниками условно обозначены гены. Отмечены положения промотора T7A1<sub>04/03</sub> с *lac* оператором (P/O), терминатора транскрипции *rnnB* (T), а также использованных в гибридизации зондов (1 и 2), комплементарных *lacZ* транскриптам.

Для замедления рибосом мы использовали хлорамфеникол (Cm), специфический ингибитор элонгации трансляции. Хлорамфеникол в концентрации, которую мы применяли (1 мкг/мл), оказывает лишь мягкий ингибирующий эффект на бактериальный рост. В отсутствие антибиотика скорость элонгации транскрипции гена *lacZ* в использованных условиях роста клеток в экспоненциальной фазе составила ~42 нуклеотида в секунду (нт/с), что точно соответствует скорости элонгации трансляции ~14 аминокислотных остатков в секунду (а.о./с) (рис. 2 и 3). Однако снижение скорости трансляции с помощью хлорамфеникола до 9 а.о./с повлекло соответствующее уменьшение скорости элонгации транскрипции до 27 нт/с (рис. 2 и 3). Для подтверждения гипотезы, что рибосома непосредственно контролирует скорость транскрипции, мы воспользовались штаммом *E. coli* с хромосомными мутациями в гене *rpsL* (Ruusala et al., 1984), кодирующем рибосомный белок S12. Этот штамм (CH184) характеризуется сниженной скоростью элонгации трансляции, однако стрептомицин (Sm) стимулирует почти двукратное увеличение скорости трансляции. Действительно, в отсутствие антибиотика скорость трансляции составила 6 а.о./с, а при добавлении 100 мкг/мл стрептомицина возросла до 10 а.о./с, что согласуется с описанными ранее данными (Ruusala et al., 1984). Скорость элонгации транскрипции в этом штамме составила 19 нт/с, однако в присутствии стрептомицина выросла до 30 нт/с (рис. 2 и 3), что соответствует изменению в скорости трансляции. Противоположный эффект трансляционных антибиотиков (Cm и Sm) на элонгацию транскрипции (замедление и

ускорение рибосом) показывает, что рибосома определяет скорость движения РНК-полимераз по матрице ДНК. Влияние носит взаимный характер, поскольку, очевидно, что рибосома не может вести трансляцию быстрее, чем РНК-полимераза синтезирует РНК.



**Рисунок 2.** Скорость элонгации транскрипции зависит от скорости трансляции. Эффект хлорамфеникола (Cm) (А) на элонгацию транскрипции в штамме Mg1655 и стрептомицина (Sm) в штамме CN184 (Б). Представлены типичные результаты гибридизации РНК с проксимальным (1) и дистальным (2) зондом. Время отсчитывалось от момента добавления IPTG к клеткам. Скорость элонгации транскрипции определяли, используя графики зависимости приращения сигнала гибридизации от времени после индукции транскрипции *lacZ*.



**Рисунок 3.** Эффект Cm и Sm на скорость элонгации трансляции. Кинетика образования о-нитрофенола представлена как функция квадратного корня из нормированных значений поглощения образцов (A) (420 нм) от времени. Время, необходимое для синтеза первых мономеров  $\beta$ -галактозидазы, найдено после экстраполяции функции к нулевым значениям поглощения.

Мы обнаружили соответствие скоростей транскрипции и трансляции в различных условиях культивирования клеток, включая разные источники углерода и фазы роста (табл. 1). В стационарной фазе транскрипция и трансляция согласованно замедляются в клетках “дикого типа” (MG1655) или штамма с “медленной рибосомой” (CH184). Кроме того, Sm ускоряет и транскрипцию, и трансляцию в стационарной фазе роста в клетках CH184 до уровня, наблюдаемого в MG1655 в стационарной фазе. Таким образом, транскрипция находится под строгим трансляционным контролем в меняющихся условиях роста бактерий.

**Таблица 1.** Средняя скорость элонгации транскрипции соответствует скорости элонгации трансляции в различных условиях роста клеток. Указанные штаммы растили в среде LB до  $OD_{600}$  0.4, если не указано иное. В стационарной фазе индукцию проводили при  $OD_{600}$  2.5. В качестве альтернативных источников углерода также использовали глицерин (0.5%) или  $\alpha$ -метил-глюкозид (в отношении 15:1 к глюкозе). (\*) В каждом случае данные получены на основе трех-четырех повторностей опыта. В то время как абсолютные значения сигналов гибридизации могли меняться от опыта к опыту, расчетная скорость транскрипции и трансляции воспроизводилась с относительным стандартным отклонением не более 15%.

Штамм	Условия роста клеток	Скорость транскрипции* (нт/с)	Скорость трансляции* (а.о./с)
MG1655		42	14
MG1655	+Cm	27	9
MG1655	стационарная фаза	21	7
MG1655	глицерин	31	10
MG1655	$\alpha$ MG	23	8
CH184	+Sm	31	10
CH184		19	6
CH184	стационарная фаза +Sm	22	7
CH184	стационарная фаза	12	4

## 1.2. Структурные изменения элонгационного комплекса РНК-полимеразы под влиянием рибосомы

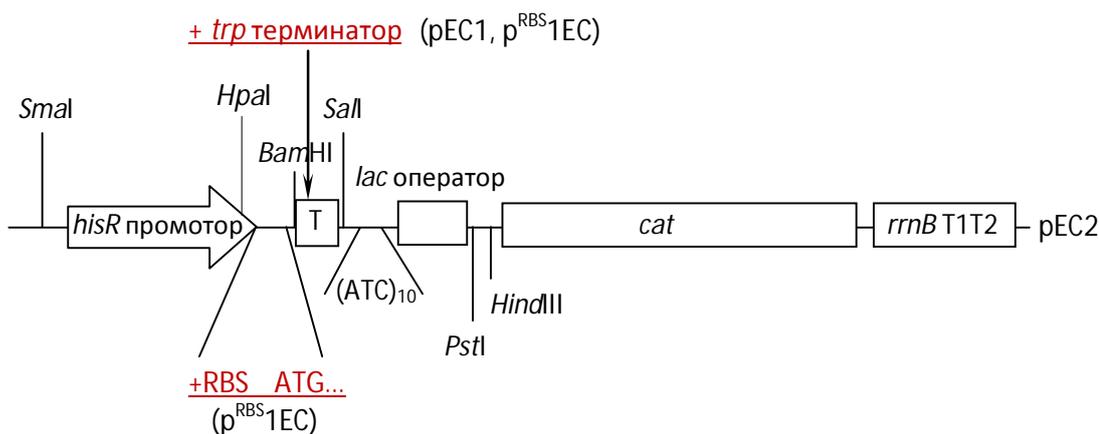
В ходе транскрипции часто происходят спонтанные возвратные смещения РНК-полимеразы вдоль ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo* (Komissarova and Kashlev, 1997; Nudler et al., 1997; Toulme et al., 1999). При этом 3'-конец РНК выходит из активного центра, что приводит к паузам в транскрипции или остановкам транскрипции с образованием инактивированных элонгационных комплексов. Подобного рода паузы и остановки могут задавать среднюю скорость элонгации транскрипции (Epshtein and Nudler, 2003; Epshtein et al., 2003). Ранее было показано, что элонгационный комплекс РНК-полимеразы способен подавлять откат впереди идущего элонгационного комплекса (Epshtein and Nudler, 2003; Epshtein et al., 2003). Поскольку при откате РНК-полимеразы синтезируемая РНК проходит через фермент в обратном направлении, транслирующая рибосома может ингибировать такое смещение, сдвигая элонгационный комплекс вперед. В результате, контролируя паузы и остановки транскрипции, рибосома может определять скорость транскрипции.

Для проверки этой гипотезы мы разработали модельную систему, которая позволяет детектировать влияние рибосомы на смещение РНК-полимеразы *in vivo*. За основу была взята плаزمида р2ЕС, на которой РНК-полимераза начинает транскрипцию с конститутивного промотора *hisR* и останавливается на расстоянии 64 нуклеотида от старта транскрипции перед *Lac* репрессором, связанным с последовательностью *lac* оператора (Epshtein et al., 2003; Guerin et al., 1996) (рис. 4). Ранее было показано, что при столкновении РНК-полимеразы с белком, связанным с ДНК, элонгационный комплекс смещается против хода транскрипции *in vitro* и *in vivo*, и такое возвратное смещение ограничивает способность РНК-полимеразы проходить через препятствие на матрице ДНК (Epshtein et al., 2003). Остановка РНК-полимеразы на данной плазмиде происходит в пределах тринуклеотидного повтора (АТС)<sub>10</sub>, что позволяет с высокой точностью локализовать положение элонгационного комплекса на матрице ДНК.

Для устранения эффектов, связанных с влиянием на остановленную РНК-полимеразу следующих за ней других молекул РНК-полимераз (Epshtein and Nudler, 2003; Epshtein et al., 2003), мы приготовили генно-инженерную конструкцию, позволившую получить *in vivo* изолированный элонгационный комплекс (рис. 4). Мы модифицировали плазмиду рЕС2, клонировав Rho-независимый терминатор транскрипции *trp* между промотором и оператором. Нуклеотидная последовательность терминатора была введена с таким расчетом, чтобы между политимидиновой последовательностью терминатора и операторным участком мог поместиться только один элонгационный комплекс РНК-полимеразы. В полученной

плазмиде рЕС1 уникальный сайт *Bam*HI расположен между промотором и терминатором, что отличает ее от описанной ранее плазмиды рАТС-Тер (Epshtein et al., 2003).

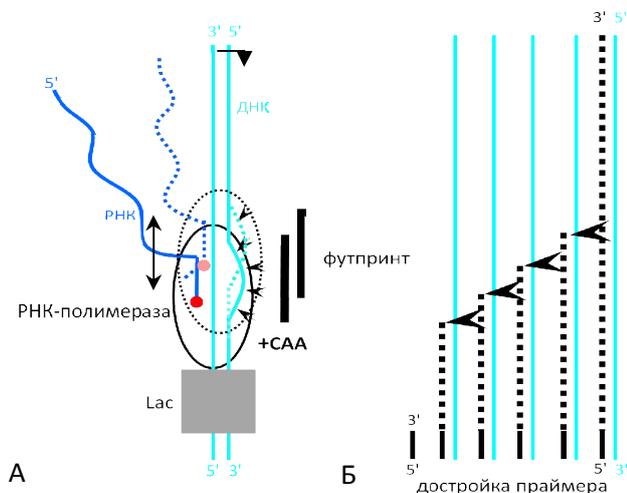
На основе рЕС1 нами была сконструирована плазида р<sup>RBS</sup>1ЕС, содержащая последовательность Шайна-Дальгарно (SD), энхансер трансляции гена 10 бактериофага Т7 (Olins and Rangwala, 1989) и АТG кодон на расстоянии 120 нуклеотидов от *lac*-оператора (рис. 4). Между иницирующим кодоном и *lac* оператором формируется открытая рамка считывания. Нуклеотидные последовательности полученных плазмид рЕС1 и р<sup>RBS</sup>1ЕС между *hisR* промотором и *lac* оператором были проверены секвенированием.



**Рисунок 4.** Модельная система для изучения изолированного элонгационного комплекса РНК-полимеразы и анализа влияния на него рибосомы *in vivo*. Плазида рЕС1 получена на основе рЕС2 добавлением терминатора *trp*. Плазида р<sup>RBS</sup>1ЕС – производная от рЕС1, в которой закодирован сайт связывания рибосомы (RBS) и содержится открытая рамка считывания. Элонгационный комплекс РНК-полимеразы остановлен на участке с тринуклеотидными повторами (АТC)<sub>10</sub> перед Лас репрессором. Терминатор транскрипции *trp* (Т) в плаزمиде рЕС1 и р<sup>RBS</sup>1ЕС размещен таким образом, что последующая РНК-полимераза останавливается точно на терминаторе и отделяется от матрицы.

Для определения положения элонгационного комплекса на матрице ДНК *in vivo* использовали хлорацетальдегид (САА), специфичный к одноцепочечным участкам ДНК. САА образует имидазольные кольца между положениями N3 и N4 цитозина или N1 и N6 аденина. В двухцепочной ДНК эти группы вовлечены в образование водородных связей и не реагируют с САА (Dayn et al., 1992). В элонгационном комплексе РНК-полимеразы нематричная цепь ДНК в пределах транскрипционного пузыря находится в одноцепочечной форме, что делает реакционно-способные группы гетероциклических оснований доступными для реакции с САА. Сайты модификаций в экстрагированной из клеток ДНК определяли методом достройки праймера. В данном подходе специфический радиоактивно меченный по 5'-концу праймер гибридизуется с выделенной ДНК и удлиняется *in vitro* ДНК-полимеразой, которая прекращает синтез цепи ДНК в сайтах модификаций (рис. 5). Продукты удлинения праймера с одинаковым 5'-концом, но

различающиеся по 3'-концу в соответствии с позициями модификаций, анализировали в денатурирующем полиакриламидном геле.



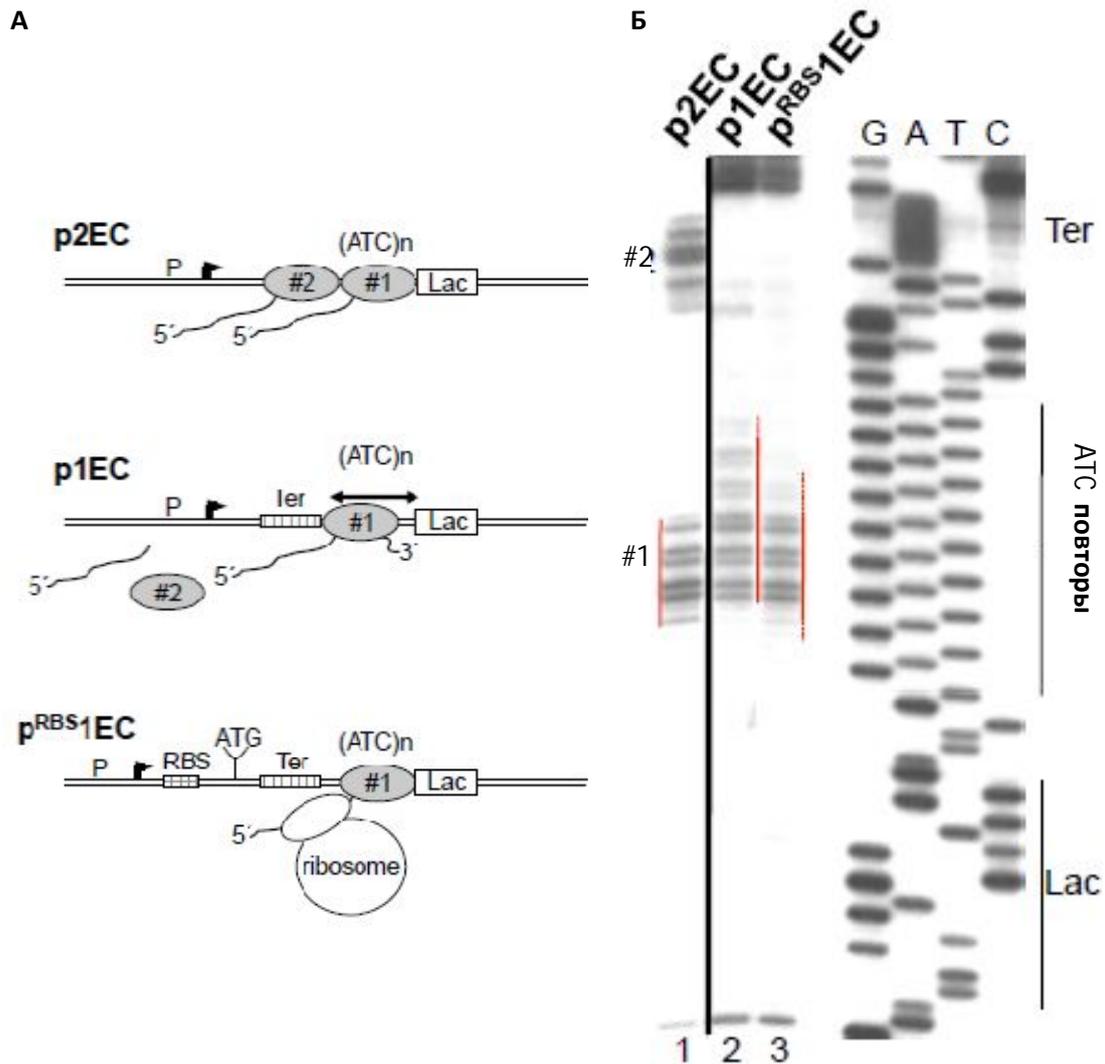
**Рисунок 5.** Локализация *in situ* элонгационного комплекса РНК-полимеразы на матрице ДНК с помощью хлорацетальдегида (САА). (А) Схематично показан остановленный перед репрессором элонгационный комплекс, который находится в динамическом равновесии между активированным состоянием (3'-конец РНК в активном центре фермента) и неактивным состоянием (при смещении РНК-полимеразы назад). САА модифицирует азотистые основания в одноцепочечном участке ДНК транскрипционного пузыря. (Б) Модифицированные основания ДНК устанавливаются с помощью удлинения праймера ДНК-полимеразой.

В результате анализа полученных футпринтов, как и ожидалось, на плазмиде рЕС2 было обнаружено два остановленных перед репрессором элонгационных комплекса РНК-полимеразы, а на плаزمиде рЕС1 и р<sup>RBS</sup>1ЕС – по одному (рис. 6). Однако положение РНК-полимеразы, находящейся непосредственно перед репрессором, на этих матрицах существенно отличается. Изолированная РНК-полимераза на матрице рЕС1 в большей степени смещается назад, чем соответствующая РНК-полимераза на матрице р<sup>RBS</sup>1ЕС (или рЕС2): на рЕС1 повышается чувствительность к САА оснований у верхней границы футпринта и снижается у нижней (рис. 6). Таким образом, аналогично эффекту предшествующего элонгационного комплекса на впереди идущий комплекс (дорожка 1 на рис. 6) (Epshtein et al., 2003), рибосома препятствует откату РНК-полимеразы.

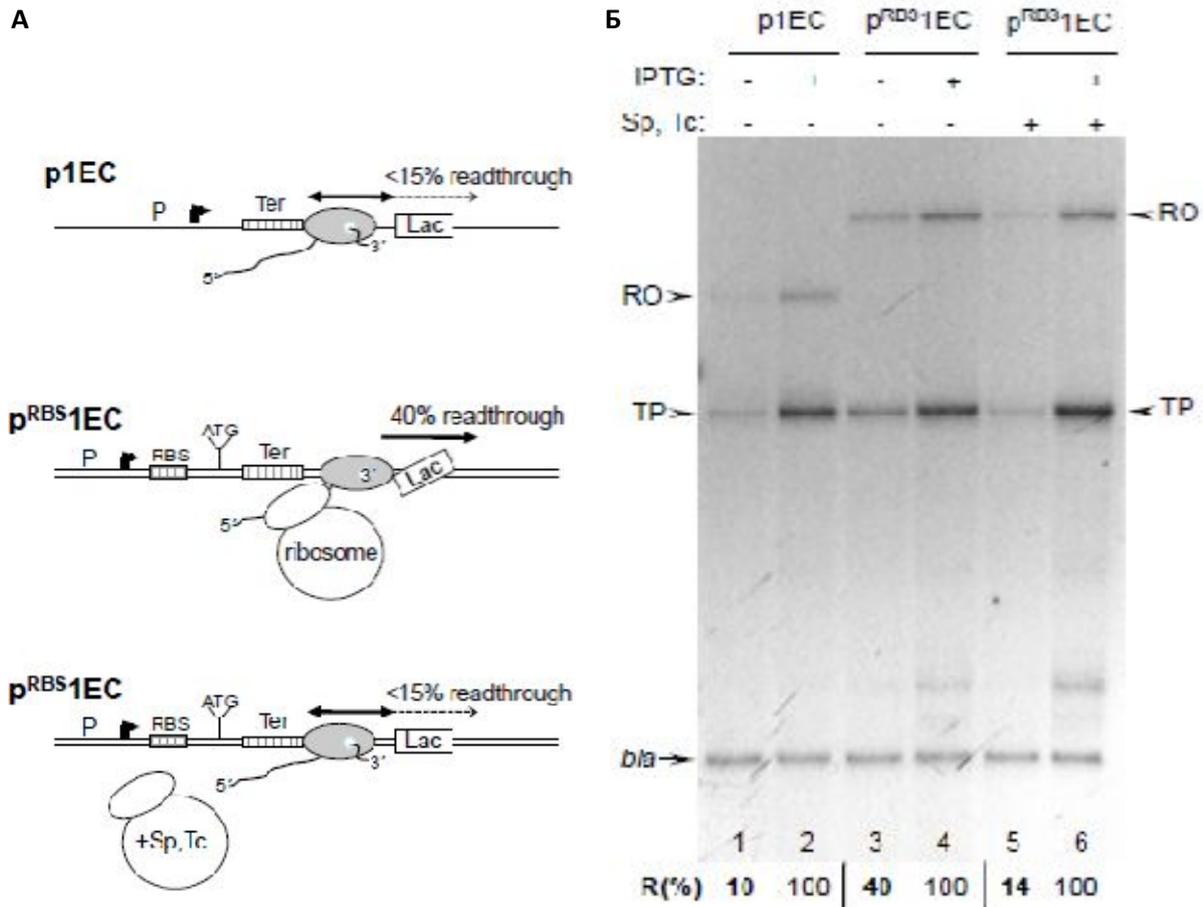
### 1.3. Влияние рибосомы на прохождение РНК-полимеразой участков ДНК, связанных с белками

Поскольку ингибирование возвратных смещений облегчает прохождение РНК-полимеразой участков матрицы ДНК, связанных с белками (Epshtein et al., 2003), рибосома также может способствовать преодолению РНК-полимеразой этих участков. Мы напрямую проверили это предположение, сравнив количество мРНК *cat*, синтезируемой за репрессором на матрицах р1ЕС и р<sup>RBS</sup>1ЕС (рис. 7). Накопление мРНК *cat* оценили с помощью обратной транскрипции с праймера, комплементарного участку ДНК за оператором. Для нормирования проб оценивали также количество мРНК *bla*, используя специфичный праймер. На матрице р1ЕС, не кодирующей рибосом-связывающего участка, только ~10%

элонгационных комплексов РНК-полимераз преодолевают связанный с матрицей ДНК Lac репрессор. Однако доля элонгационных комплексов, транскрибирующих ДНК ниже репрессора, возрастает до 40% на матрице  $p^{RBS}1EC$ , кодирующей рибосом-связывающий участок. В то же время ингибирование элонгации трансляции антибиотиками производит обратный эффект. Таким образом, функциональное взаимодействие *in vivo* между рибосомой и РНК-полимеразой облегчает прохождение РНК-полимеразой участков матрицы ДНК, связанных с белками.



**Рисунок 6.** Рибосома подавляет возвратное смещение РНК-полимеразы. (А) Схема конструкций  $p2EC$ ,  $p1EC$  и  $p^{RBS}1EC$ . (Б) Модификации САА *in situ* нематричной цепи ДНК в плаزمидах  $p2EC$  (дорожка 1),  $p1EC$  (дорожка 2) и  $p^{RBS}1EC$  (дорожка 3) проанализированы методом достройки праймера. В присутствии второй РНК-полимеразы (дорожка 1) или транслирующей рибосомы (дорожка 3) остановленная перед препятствием РНК-полимераза сдвигается вперед по ходу транскрипции.



**Рисунок 7.** Вклад рибосомы *in vivo* в преодоление РНК-полимеразой белков, связанных с ДНК. (А) Схема, описывающая кооперативный механизм. Рибосома реактивирует остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Каталитически компетентный элонгационный комплекс РНК-полимеразы проходит через препятствие в виде Лас-репрессора, как только произойдет диссоциация последнего и матрицы ДНК. Ингибирование элонгации трансляции антибиотиками (Sp, Tc) нарушает кооперативный механизм, снижая эффективность прохождения препятствия РНК-полимеразой. (Б) На радиоавтографе представлены продукты обратной транскрипции с <sup>32</sup>P-меченых праймеров, гибридизующихся с РНК-транскриптами генов *cat* или *bla* (для нормировки). Стрелками отмечена полноразмерная ДНК, полученная при обратной транскрипции мРНК *cat* (RO, runoff), и цепь ДНК, синтез которой прерван терминационной шпилькой на этой же матрице РНК (TP). За эффективность преодоления РНК-полимеразой препятствия на матрице ДНК (R, %) принята доля продуктов обратной транскрипции (RO+TP) от числа продуктов (100%) в условиях дерепрессии (+IPTG).

## 2. Координация транскрипции и репарации ДНК

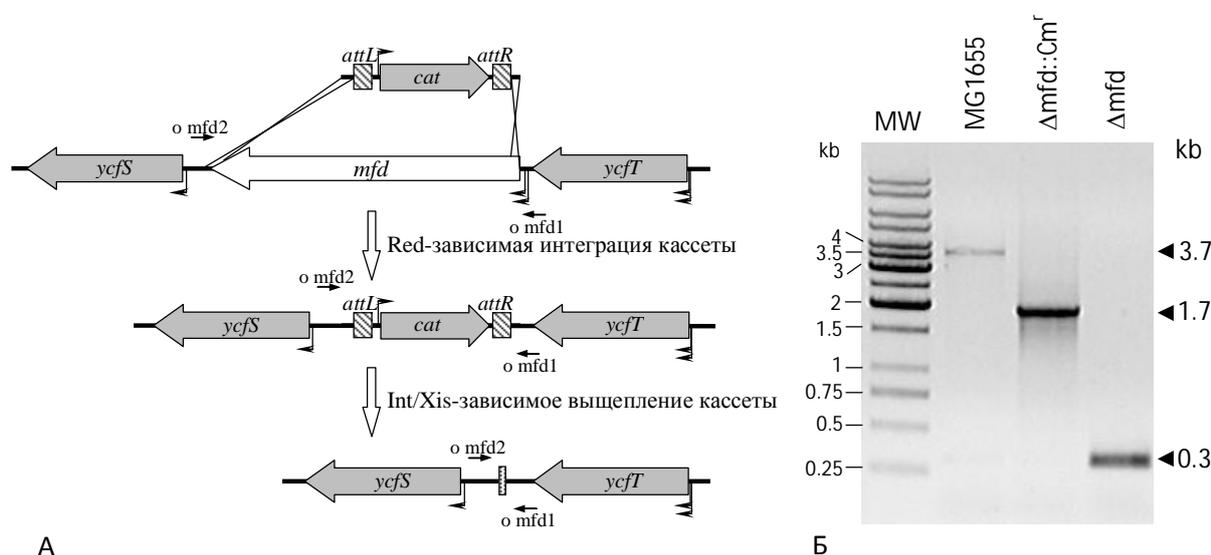
Единственный известный у бактерий фактор, связывающий транскрипцию с репарацией, - Mfd (Park et al., 2002; Selby and Sancar, 1993). *In vitro* Mfd смещает остановленную РНК-полимеразу вперед по ходу транскрипции и в конечном итоге удаляет

ее с матрицы (Park et al., 2002). Согласно принятой модели Mfd привлекает к поврежденному участку ДНК димер UvrA, запуская эксцизионную репарацию нуклеотидов.

## 2.1. Воздействие Mfd на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*

### Инактивация гена *mfd* *E. coli*

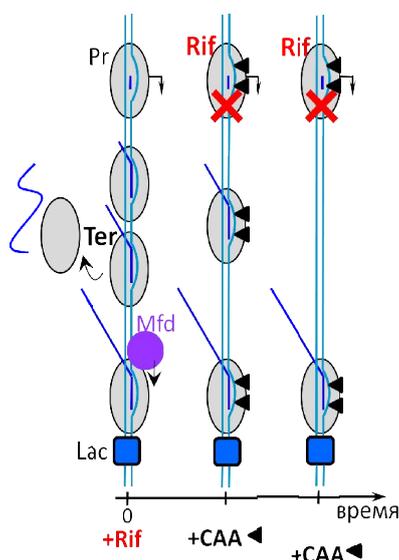
Для изучения физиологической роли фактора Mfd мы инактивировали кодирующий его ген в *E. coli*. Для инактивации использовали метод, основанный на Red-зависимой рекомбинации (Datsenko and Wanner, 2000). Нуклеотидная последовательность *mfd* в хромосоме заменялась селективным маркерным геном *cat*, фланкированным сайтами  $\lambda$ attL и  $\lambda$ attR (рис. 8). Интегрируемый фрагмент ДНК амплифицировали с плазмиды pMW118- $\lambda$ attL-Cm<sup>R</sup>- $\lambda$ attR (Каташкина и соавторы, 2005) с помощью олигонуклеотидов, 5'-концы которых содержат 36-нуклеотидные последовательности, гомологичные N- и C- концевым областям структурного гена *mfd*. Сайты  $\lambda$ attL и  $\lambda$ attR позволяют вырезать маркерный ген после отбора интегрантов с помощью вспомогательной плазмиды pMW-int/xis, используя Int/Xis-зависимую систему рекомбинации фага  $\lambda$ . Для подтверждения интеграции кассеты  $\lambda$ attL-Cm<sup>R</sup>- $\lambda$ attR в ген *mfd* и ее последующее выщепление провели ПЦР на матрице хромосомной ДНК с фланкирующими *mfd* праймерами (рис. 8).



**Рисунок 8.** Инактивация гена *mfd*. (А) Схема интеграции кассеты  $\lambda$ attL-*cat*- $\lambda$ attR в хромосомный локус *mfd* и ее выщепление с образованием делеции  $\Delta mfd$ . (Б) Проверка интеграции и выщепления кассеты с помощью ПЦР с праймерами *mfd1* и *mfd2* на матрице хромосомной ДНК из указанных штаммов. Слева указаны длины (в т.п.о.) маркера ДНК (MW), справа - расчетные длины амплифицированных фрагментов ДНК.

### Взаимодействие *Mfd* с остановленным элонгационным комплексом РНК-полимеразы

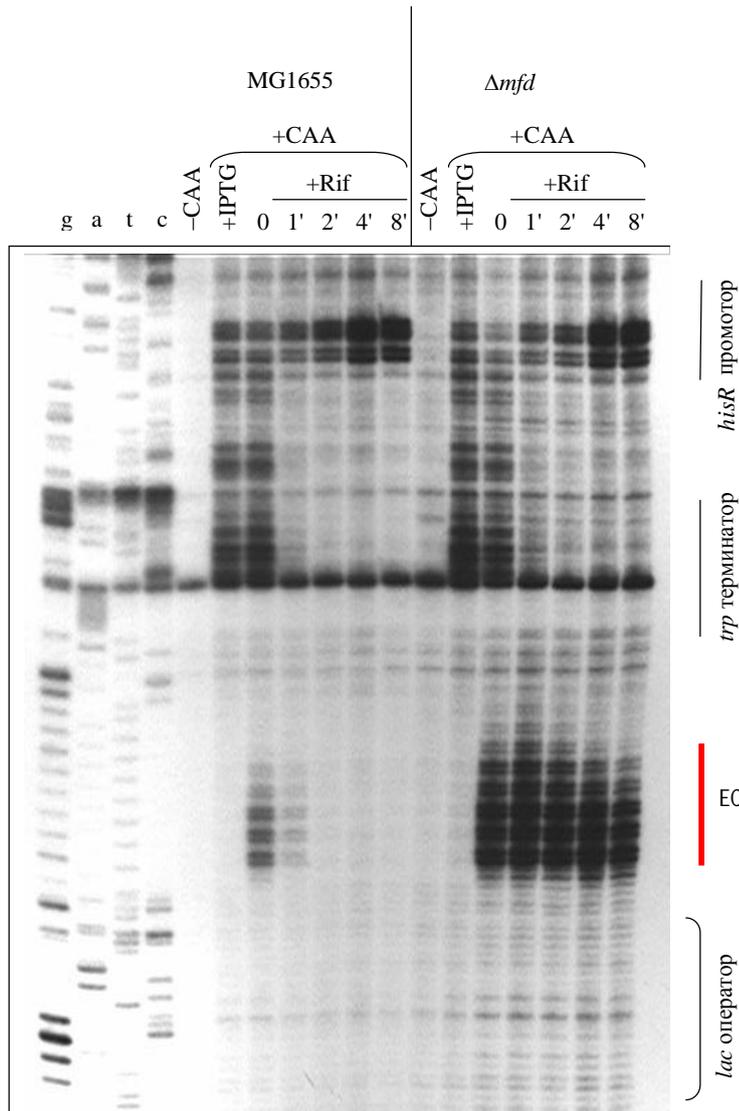
Для исследования влияния, которое оказывают транскрипционный фактор *Mfd* на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*, мы сравнили положение остановленного элонгационного комплекса РНК-полимеразы на матрице рЕС1 в двух изогенных штаммах *E. coli*: дикого типа (MG1655) и мутанте с инактивированным геном *mfd*. Тестирование провели, используя метод футпринтинга *in situ* (Toulme et al., 1999). Для того чтобы следить за изменениями, которые происходят с элонгационным комплексом с течением времени, мы использовали рифампицин, позволяющий ингибировать новые раунды транскрипции с промотора, и через определенные временные интервалы после добавления антибиотика проводили модификацию оснований одноцепочечных участков матрицы ДНК с помощью хлорацетальдегида (CAA) (рис. 9).



**Рисунок 9.** Схема модельной системы с остановленным перед белком-репрессором элонгационным комплексом РНК-полимеразы на матрице рЕС1. После прекращения новых раундов транскрипции рифампицином (+Rif) определяли положение элонгационного комплекса *in situ* с помощью хлорацетальдегида (+CAA). Отмечено положение промотора (Pr), терминатора (Ter) и репрессора (Lac).

В штамме дикого типа (MG1655) реакционная способность оснований между терминатором и *lac* оператором быстро уменьшается после добавления рифампицина, что говорит о резком сокращении числа остановленных перед препятствием на матрице элонгационных комплексов. Исчезновение остановленных элонгационных комплексов с течением времени в условиях, когда нет поступления новых комплексов с промотора, может происходить при активном удалении их с матрицы и/или прохождении ими через препятствие. По сравнению со штаммом дикого типа в штамме с инактивированным геном *mfd* наблюдается сильное увеличение в реактивности оснований перед оператором, т.е. в области, где находится остановленный элонгационный комплекс (рис. 10). Кроме того, после ингибирования новых раундов транскрипции рифампицином уменьшение реакционной способности оснований в этом районе происходит гораздо медленнее, чем в штамме дикого типа. Таким образом, в мутантном штамме, в котором отсутствует фактор *Mfd*, перед

препятствием на матрице накапливается большее число РНК-полимераз и они проводят там гораздо большее время по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 10).



**Рисунок 10.** Мишенью для фактора Mfd *in vivo* служит остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Модификации нематричной цепи ДНК в штаммах MG1655 (wt) и MG1655  $\Delta mfd$  проведены хлорацетальдегидом (+CAA) и проанализированы методом достройки праймера. Модификации проводились через указанные промежутки времени (в минутах) после добавления рифампицина (+Rif). Отмечено положение изолированного элонгационного комплекса (EC), *lac* оператора, *trp* терминатора и *hisR* промотора.

Наши результаты, полученные *in vivo*, указывают на то, что для функционирования Mfd не обязательно наличия поврежденной ДНК, при этом действие фактора направлено на остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы, что согласуется с данными *in vitro* (Park et al., 2002; Selby and Sancar, 1993). Остановка РНК-полимеразы может стать предпосылкой к возвратным смещениям элонгационного комплекса, и транслирующие рибосомы играют ключевую роль в подавлении таких смещений (Proshkin et al., 2010). Однако в условиях, когда трансляция неэффективна или отсутствует (например, в некодирующих областях), в клетке существуют альтернативные механизмы подавления избыточных возвратных смещений РНК-полимераз, один из которых основан на действии Mfd (Dutta et al., 2011).

Однако генетические и биохимические данные указывают на ограниченную роль Mfd в сопряжении транскрипции с репарацией ДНК: 1) клетки *E. coli* с инактивированным геном

*mfd* проявляют лишь небольшую чувствительность к ультрафиолетовому излучению (Schalow et al., 2012; Selby and Sancar, 1993; Witkin, 1966); 2) некоторые типы повреждений ДНК устраняются TCR без участия Mfd (Schalow et al., 2012); 3) TCR лишь частично зависит от Mfd на активно транскрибируемых генах (Kunala and Brash, 1995); 4) NusA задействован в TCR независимо от Mfd (Cohen et al., 2010); 5) Mfd очень медленно терминирует транскрипцию (Howan et al., 2012; Park et al., 2002). Таким образом, вероятно, существуют дополнительные факторы, связывающие транскрипцию с репарацией ДНК.

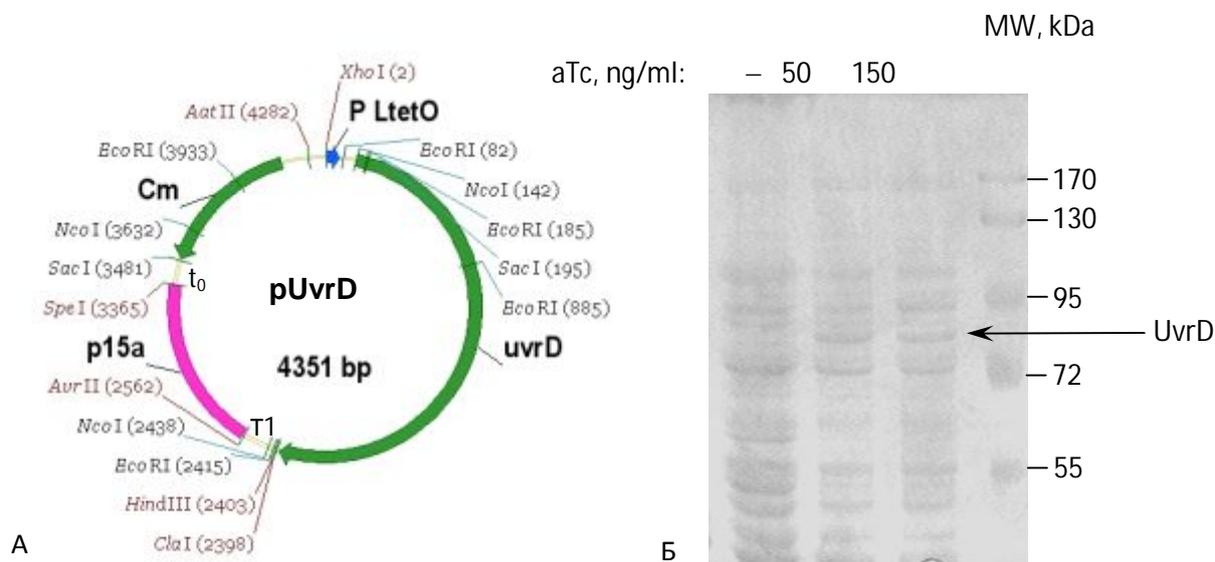
## 2.2. Роль фактора UvrD в координации транскрипции и репарации ДНК

В лаборатории проф. Нудлера (Nudler, New York University) в результате протеомного анализа химически сшитых *in vivo* с РНК-полимеразой белковых комплексов было обнаружено, что белок эксцизионной репарации нуклеотидов UvrD напрямую взаимодействует с РНК-полимеразой *E.coli*. Эти данные также нашли подтверждение в опытах *in vitro* (Epshtein et al., 2014). UvrD – ДНК-хеликаза суперсемейства 1 и 3'-5' транслоказа, обладающая оцДНК-зависимой АТФ-азной активностью (Kumura and Sekiguchi, 1984; Lee and Yang, 2006; Matson and George, 1987). В настоящей работе мы исследовали влияние фактора UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* и его роль в сопряжении транскрипции с репарацией ДНК.

### *Суперпродукция UvrD в клетках E.coli*

Генно-инженерная конструкция для индуцированной суперэкспрессии *uvrD* была создана на базе вектора pZA31, содержащего регулируемый промотор P<sub>LtetO-1</sub> (Lutz and Bujard, 1997). Этот промотор сконструирован на базе промотора P<sub>L</sub> фага λ, в котором сайты связывания репрессора cI заменены на нуклеотидные последовательности оператора 2 (*tetO2*) оперона *tet* устойчивости к тетрациклину транспозона Tn10. В результате промотор регулируется *Tet* репрессором, что позволяет в данной системе использовать в качестве индуктора ангидротетрациклин. Плазмида pZA31 содержит ориджин репликации p15a, что делает ее совместимой с плазмидами на основе ColE1 репликона (рис. 11).

Для обеспечения синтеза репрессора TetR его ген помещен под контроль конститутивного промотора P<sub>N25</sub> в составе экспрессионной кассеты (Z1), несущей также ген устойчивости к спектиномицину и *lacI*. Кассета интегрирована в бактериальную хромосому по сайту интеграции фага λ и может быть перенесена трансдукцией в тестируемые штаммы *E.coli*.



**Рисунок 11.** Суперпродукция UvrD в клетках *E.coli*. (А) Схема экспрессионной плазмиды pUvrD. (Б) Электрофоретическое разделение белков из клеток, несущих плазмиду pUvrD, для анализа индукции биосинтеза UvrD ангидротетрациклином.

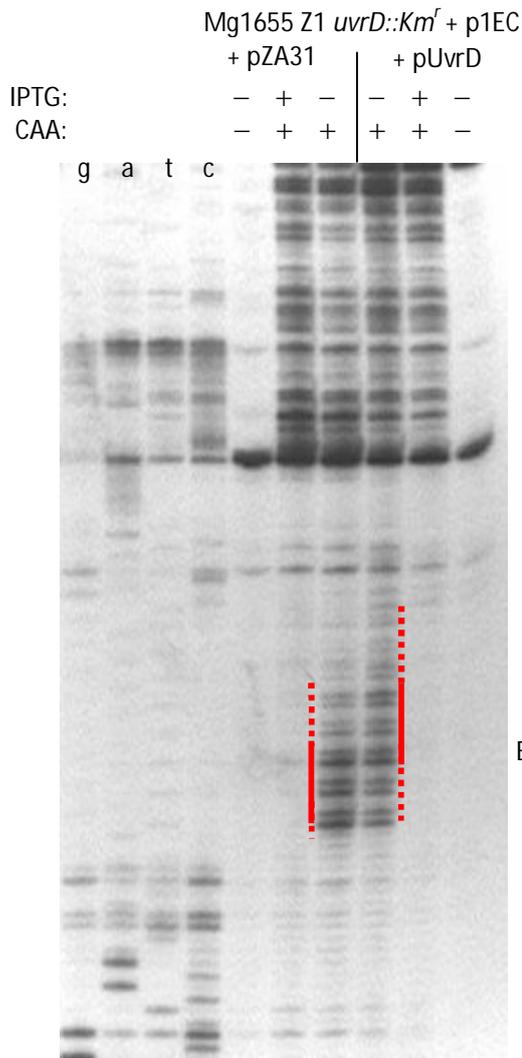
### **Инактивация генов *uvrD*, *greA* и *greB* *E.coli***

Для инактивации генов *uvrD*, *greA* и *greB* *E.coli* применили описанный выше подход на основе Red-зависимой рекомбинации (Datsenko and Wanner, 2000). В данном случае интегрируемая кассета включала ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами FRT. Для элиминации маркерного гена использовали плазмиду pCP20, кодирующую FLP рекомбиназу. Объединение мутаций в одном штамме MG1655Z1 проводили с помощью трансдукции фагом P1.

### **Влияние UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo***

Для изучения влияния UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* мы использовали плазмиду p1ЕС. Штамм *E. coli* MG1655 Z1  $\Delta$ *uvrD*, содержащий p1ЕС, трансформировали плазмидой pUvrD или исходным вектором pZA31. Для индукции синтеза UvrD в клетках использовали ангидротетрациклин. Положение элонгационного комплекса на матрице ДНК *in vivo* установили с помощью САА. Область матрицы ДНК p1ЕС, где модификация оснований происходит только в отсутствие IPTG (т.е. когда Lac репрессор связан с матрицей p1ЕС и физически препятствует движению РНК-полимеразы), соответствует положению одиночного элонгационного комплекса, остановленного перед репрессором. Анализ полученных футпринтов (рис. 12) показал, что под влиянием UvrD *in vivo* происходит большее смещение РНК-полимеразы против хода транскрипции, чем в отсутствие фактора: у верхнего участка футпринта усиливается чувствительность гетероциклических оснований к САА, а у нижнего участка – снижается. Т.е. *in vivo* UvrD смещает остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции. Такой эффект UvrD на элонгационный комплекс может иметь большое значение для репарации повреждений в ДНК, когда РНК-полимераза останавливается на

поврежденном сайте ДНК и ее необходимо сместить для доступа к повреждению репарационных белков.

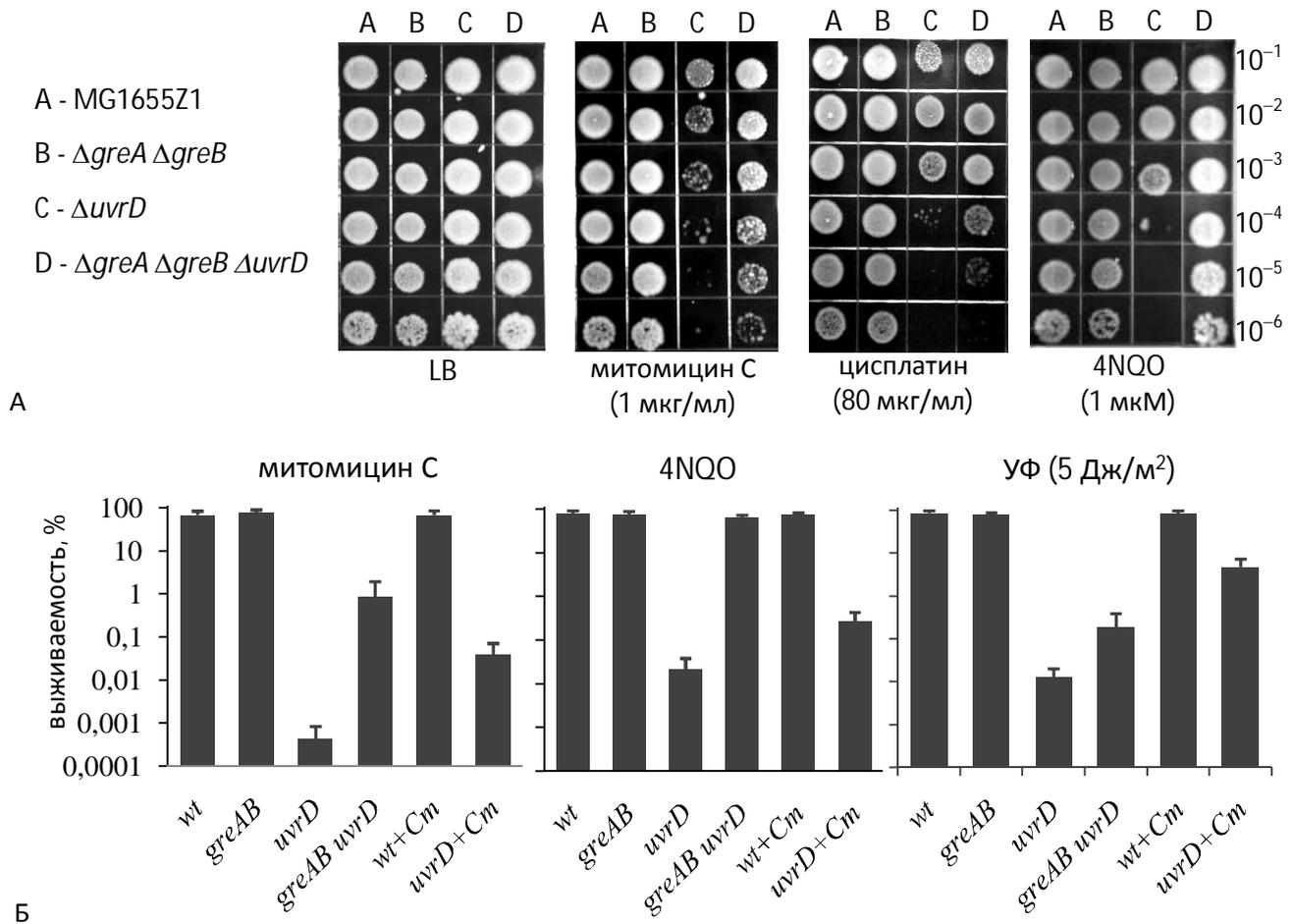


**Рисунок 12.** Возвратное смещение (backtracking) элонгационного комплекса (ЕС) РНК-полимеразы под действием UvrD *in vivo*. Представлен радиоавтограф футпринта *in situ* остановленного ЕС. Модификация одноцепочечного участка ДНК транскрипционного пузыря ЕС проведена хлорацетальдегидом (+CAA). В присутствии UvrD (pUvrD) остановленный ЕС смещается дальше, чем ЕС, не испытывающий действие UvrD (pZA31).

Мы протестировали чувствительность штамма с инактивированным геном *uvrD* к различным мутагенам: митомицину С, 4-нитрохиолин-1-оксиду (4NQO), цисплатину и ультрафиолетовому излучению (УФ). Эти мутагены приводят к сшивкам и объемным модификациям ДНК, устранимым белками эксцизионной репарации нуклеотидов. Клетки *uvrD*(-) оказались гораздо более чувствительны к повреждению ДНК указанными реагентами и УФ, чем клетки исходного штамма с неповрежденным геном *uvrD* (рис. 13). Кроме того, чувствительность *uvrD*(-) клеток к различным мутагенам гораздо выше, чем клеток с инактивированным геном *mfd*.

Если возвратное смещение РНК-полимеразы действительно необходимо для эффективной репарации транскрибируемой ДНК, то подавление факторов, в норме препятствующих возвратному смещению РНК-полимеразы, должно способствовать устранению повреждений в ДНК. Действительно, инактивация генов *greA/greB* супрессирует

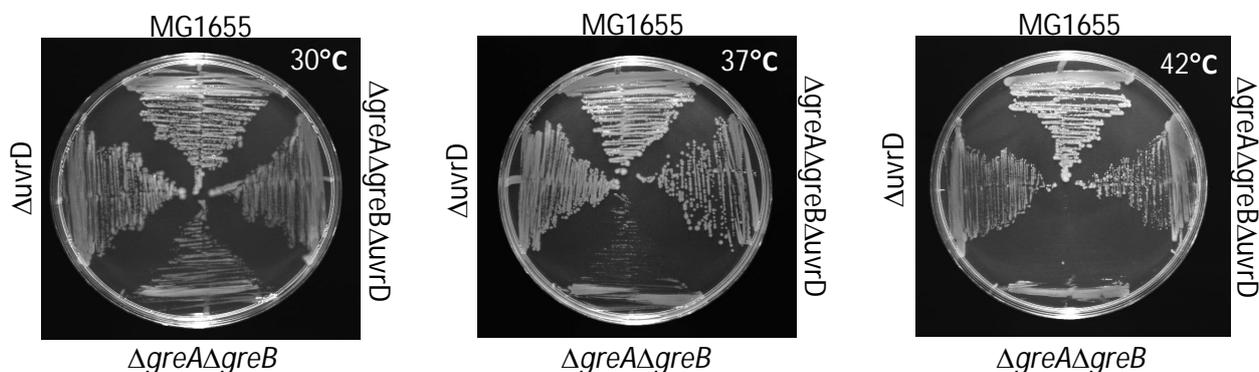
чувствительность делеционного мутанта *uvrD* ко всем протестированным нами генотоксичным реагентам и УФ (рис. 13).



**Рисунок 13.** Инактивация *greA/greB* или замедление трансляции супрессирует чувствительность мутанта *uvrD* к генотоксичным реагентам и УФ. (А) Рост клеток из серии последовательных разведений (1:10) бактериальных культур на LB-агаре с указанными мутагенами после инкубации в течение 24 ч при 30°C. (Б) Анализ чувствительности штаммов *E. coli* к митомоцину С, 4-нитрохинолин-1-оксиду (4NQO) и УФ-излучению.

Интересно, что *UvrD* противодействует *GreA/B* даже при нормальных условиях роста клеток, поскольку инактивация *uvrD* супрессирует термочувствительность двойного мутанта *greA greB* (рис. 14).

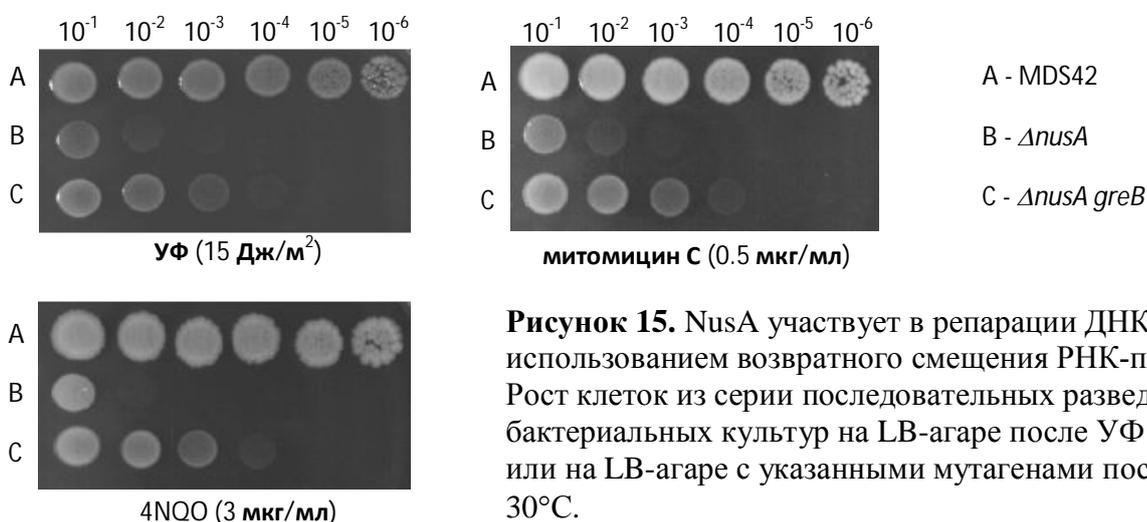
Транслирующие рибосомы подавляют спонтанные возвратные смещения РНК-полимеразы (Proshkin et al., 2010), а их ингибирование повышает устойчивость клеток к УФ-повреждениям (Doudney and Rinaldi, 1985; Hanawalt, 1966). Действительно, задержка рибосом сублетальной дозой хлорамфеникола делает клетки *uvrD(-)* более устойчивыми к митомоцину С, 4-нитрохинолин-1-оксиду и УФ (рис. 13). Таким образом, для эксцизионной репарации нуклеотидов в течение генотоксичного стресса *UvrD* конкурирует с факторами, препятствующими откату РНК-полимеразы.



**Рисунок 14.** Инактивация *uvrD* супрессирует термочувствительный фенотип штамма *ΔgreAΔgreB*.

### 2.3. Участие транскрипционного фактора NusA в координации транскрипции с репарацией ДНК

Недавно на основе генетических данных было сделано предположение об участии транскрипционного фактора NusA в неохарактеризованном ранее пути эксцизионной репарации нуклеотидов, отличном от Mfd-зависимого пути (Cohen et al., 2010). Поскольку фактор NusA усиливает возвратные смещения РНК-полимеразы в элонгации транскрипции (Bar-Nahum et al., 2005), NusA может играть роль в UvrD-зависимом механизме координации транскрипции с репарацией ДНК. Анализ на чувствительность к мутагенам штамма, полностью лишённого гена *nusA*, невозможен в обычном генетическом окружении из-за незаменимости этого гена для жизни *E.coli*. Однако делетирование *nusA* возможно в специально сконструированном штамме *E.coli* MDS42, из которого направлено удалены фрагменты ДНК, полученные *E.coli* горизонтальным переносом (Cardinale et al., 2008; Posfai et al., 2006). Действительно, штамм MDS42 *ΔnusA* чувствителен к УФ, митомицину С и 4-нитрохиолин-1-оксиду (рис. 15). Мы обнаружили, что инактивация гена *greB* в этом штамме приводит к супрессии чувствительности клеток *nusA(-)* к протестированным мутагенам (рис. 15). Таким образом, наши данные указывают на участие NusA в репарации ДНК и роль возвратного смещения РНК-полимеразы в этом механизме.



**Рисунок 15.** NusA участвует в репарации ДНК с использованием возвратного смещения РНК-полимеразы. Рост клеток из серии последовательных разведений (1:10) бактериальных культур на LB-агаре после УФ облучения или на LB-агаре с указанными мутагенами после 24 ч при 30°C.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Модель координации транскрипции с трансляцией

Хотя и РНК-полимераза, и рибосома действуют по принципу броуновского хrapовика (Bar-Nahum et al., 2005; Ramakrishnan, 2002; Spirin, 2009), эти молекулярные машины имеют различие в своем рабочем цикле: транслокация рибосомы по РНК практически необратима, в то время как РНК-полимераза осциллирует, смещаясь вперед-назад по матрице ДНК с одновременным движением РНК относительно фермента (Bar-Nahum et al., 2005; Komissarova and Kashlev, 1997; Nudler et al., 1997; Toulme et al., 1999). Равновесие между продуктивным (посттранслокационным) и непродуктивными (претранслокационным или сдвинутым назад) состояниями элонгационного комплекса определяет скорость элонгации транскрипции (Bar-Nahum et al., 2005). Транслирующая рибосома способна препятствовать спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы, повышая эффективность транскрипции (рис. 6 и 7). Функциональное взаимодействие рибосомы и РНК-полимеразы по своему эффекту на транскрипцию сходно с кооперативным эффектом между РНК-полимеразами (Epshtein and Nudler, 2003; Epshtein et al., 2003; Jin et al., 2010; Saeki and Svejstrup, 2009). Однако взаимодействие между РНК-полимеразами, вероятно, проявляется на генах с высоким уровнем экспрессии (например, рибосомные, стресс-индуцибельные гены). Большинство же белок-кодирующих генов имеют относительно слабые промоторы, что усиливает роль эффекта рибосом на транскрипцию. Таким образом, немонотонность элонгации транскрипции играет важную роль в ее синхронизации с трансляцией. Рибосома контролирует РНК-полимеразу, позволяя подогнать синтез РНК к трансляционным потребностям клетки (Proshkin et al., 2010). В отсутствие взаимодействия между макромолекулами можно ожидать продолжительные паузы в транскрипции. Действительно, на первых 50 нуклеотидах транскрибируемой области рядом с промотором часто находят остановленные элонгационные комплексы РНК-полимеразы (Hatoum and Roberts, 2008). Возможно, отчасти такие остановки РНК-полимераз связаны с тем, что рибосомы не могут связать РНК этих элонгационных комплексов и противодействовать паузам в транскрипции.

Интересно, что *in vivo* фактор терминации Rho локализуется вместе с РНК-полимеразой сразу после инициации транскрипции (Peters et al., 2009). Действительно, *in vitro* было показано, что Rho может быть связан с элонгационным комплексом РНК-полимеразы на всем протяжении фазы элонгации транскрипции и не нуждается в РНК-транскрипте для начального взаимодействия с РНК-полимеразой (Epshtein et al., 2010). Кроме того, связывание Rho с РНК-полимеразой достаточно сильное для того, чтобы исключить обмен молекул Rho и важно для терминации транскрипции (Epshtein et al., 2010). Каким же образом транскрипция доходит до конца даже тех генов, чьи транскрипты слабо транслируются и

потенциально содержат незащищенные рибосомами протяженные области-мишени Rho? Вероятно, паузы в транскрипции задерживают РНК-полимеразу, позволяя лидирующей рибосоме догнать РНК-полимеразу и контролировать движение до конца транслируемой области, предотвращая Rho-зависимую терминацию транскрипции.

Структурные основы прямого контакта РНК-полимеразы и рибосомы предложены в работе, в которой установлено физическое взаимодействие С-концевого домена транскрипционного фактора NusG и рибосомного белка S10 малой субчастицы рибосомы (Burmam et al., 2010). Поскольку сайт связывания NusG белка S10 экспонирован на поверхности 30S субчастицы рибосомы, а N-концевой домен NusG связывается с РНК-полимеразой (Belogurov et al., 2009), NusG может служить линкером между рибосомой и РНК-полимеразой (Burmam et al., 2010). NusG также взаимодействует с фактором терминации транскрипции Rho и необходим для его функции *in vivo* (Cardinale et al., 2008; Sullivan and Gottesman, 1992). Поскольку Rho конкурирует с S10 за связывание с С-концевым доменом NusG, активация Rho возможна только в отсутствие рибосом (Burmam et al., 2010).

Для изучения взаимодействия РНК-полимеразы и рибосомы *E. coli* недавно была предложена система сопряженной транскрипции и трансляции *in vitro* из очищенных компонентов (Castro-Roa and Zenkin, 2012). В отличие от разработанных ранее систем бесклеточной трансляции, которые нацелены главным образом на продукцию белков *in vitro* (Martin et al., 2001; Shirokov et al., 2007; Spirin et al., 1988), новый подход позволяет пошагово контролировать движение РНК-полимеразы и рибосомы. В результате показано, что рибосома, транслирующая мРНК непосредственно за РНК-полимеразой, меняет продолжительность пауз в транскрипции *in vitro* (Castro-Roa and Zenkin, 2012). Принимая во внимание отсутствие стабильной вторичной структуры использованной РНК, этот эффект может являться следствием прямого взаимодействия между молекулярными машинами, что согласуется с предложенной ранее нашей гипотезой (Proshkin et al., 2010).

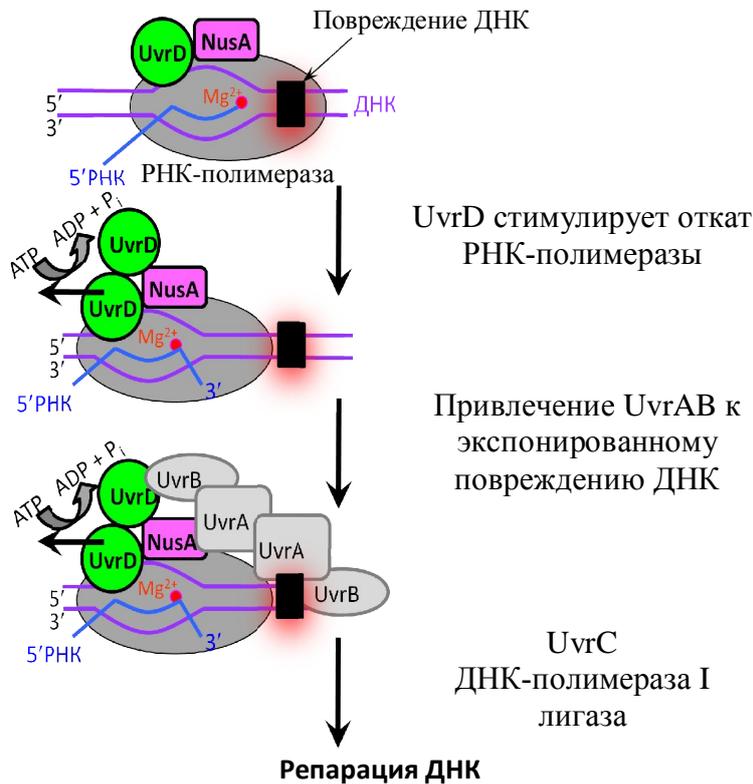
Недавние исследования показали, что обнаруженный нами эффект подавления рибосомой спонтанных возвратных смещений РНК-полимеразы *in vivo* связывает трансляцию с геномной нестабильностью у бактерий (Dutta et al., 2011). Частые столкновения РНК-полимеразы и репликативной вилки в попутном направлении неизбежны, поскольку скорость репликации на порядок выше скорости транскрипции (Kornberg, 1988). Выяснилось, что такие столкновения реплисома со сдвинутым назад элонгационным комплексом РНК-полимеразы приводят к двухцепочечным разрывам ДНК, при ошибочной репарации которых возникают мутации (Dutta et al., 2011). Транслирующие рибосомы играют важную роль в поддержании целостности белок-кодирующих генов, предотвращая откат РНК-полимеразы. Поскольку рибосомы – основной сенсор клеточного метаболизма и

стресса, сопряжение транскрипции и трансляции обеспечивает связь между условиями роста бактерий, мутагенезом и клеточной адаптацией к изменению окружающей среды.

### **Модель координации транскрипции с репарацией ДНК**

Клеточные РНК-полимеразы очень чувствительны к отклонениям в структуре матричной цепи ДНК, и в случае повреждения ДНК транскрипция на этом месте временно или постоянно блокируется (Selby and Sancar, 1990; Tornaletti, 2005). Таким образом, РНК-полимераза может служить сенсором, осуществляющим контроль качества ДНК во время транскрипции. Совместно с лабораторией Нудлера нами предложена модель координации транскрипции и репарации, ключевым компонентом которой является UvrD (рис. 16) (Epshtein et al., 2014). Мы обнаружили, что *in vivo* UvrD сдвигает остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции (рис. 12). Эта активность необходима для эксцизионной репарации нуклеотидов *in vitro* и *in vivo* (Epshtein et al., 2014). Выполненные нами в ходе этой работы генетические эксперименты с инактивацией факторов, препятствующих откату РНК-полимеразы, также подтверждают новую роль UvrD в механизме сопряжения транскрипции с репарацией ДНК.

Двойная спираль ДНК с одноцепочечным участком является предпочтительным сайтом связывания UvrD, проявляющего активность хеликазы/транслоказы (Maluf et al., 2003; Yang, 2010). Подобная структура с экспонированным одноцепочечным участком нематричной цепи ДНК присутствует в транскрипционном пузырьке и, следовательно, служит потенциальной мишенью для UvrD. Действительно, наши коллеги экспериментально установили, что в составе элонгационного комплекса РНК-полимеразы UvrD локализуется у верхней границы транскрипционного пузырька в районе домена “заслонка”  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы (Epshtein et al., 2014). Примечательно, что UvrD и NusA связываются в непосредственной близости друг от друга на поверхности РНК-полимеразы, что может объяснить участие NusA в эксцизионной репарации нуклеотидов (Cohen et al., 2010). Действительно, NusA кооперирует с UvrD *in vitro* (Epshtein et al., 2014) и роль NusA в репарации связана с возвратным смещением элонгационного комплекса (рис. 15). Кроме того, UvrD и NusA взаимодействуют с UvrB и UvrA, соответственно (Ahn, 2000; Butland et al., 2005; Cohen et al., 2010; Manelyte et al., 2009). Возможно, UvrD и NusA помимо синергетического эффекта по смещению РНК-полимеразы, в результате которого экспонируется поврежденный участок ДНК, также способствуют привлечению UvrAB к этому месту.



**Рисунок 16.** Модель координации транскрипции и репарации.

В условиях отсутствия клеточного стресса UvrD содержится в эквимольном количестве по отношению к РНК-полимеразе (около  $3 \times 10^3$  молекул на клетку) (Arthur and Eastlake, 1983). Однако при SOS-ответе внутриклеточный уровень UvrD увеличивается примерно втрое (Kumura and Sekiguchi, 1984), что может способствовать димеризации фактора. Вероятно, именно димер UvrD является активной хеликазой/транслоказой (Maluf et al., 2003) и его образование необходимо для UvrD-зависимого отката РНК-полимеразы (Epshtein et al., 2014). Такие возвратные смещения РНК-полимераз в ходе элонгации транскрипции может нарушать целостность генома в клетках, восстанавливающих от генотоксичного стресса и возобновляющих репликацию, т.к. частые столкновения в попутном направлении между реплисомой и тупиковыми элонгационными комплексами приводят к двуцепочечным разрывам ДНК (Dutta et al., 2011). Сдвигая тупиковые комплексы РНК-полимеразы вперед, Mfd подавляет появление двуцепочечных разрывов ДНК, вызванных подобными столкновениями, и, следовательно, снижает высокую частоту мутаций, связанных с репарацией этих разрывов. Данная модель согласуется с фенотипом *mfd(-)* (“*m*utation *f*requency *d*ecline”) *E. coli*, высокой УФ-мутабельностью, небольшой чувствительностью к УФ и сниженной способностью к восстановлению транскрипции после УФ-облучения (Schalow et al., 2012; Witkin, 1966). Вероятно, основную роль Mfd может играть в восстановлении клетки после избыточных возвратных смещений РНК-полимераз, связанных с SOS-ответом.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что лидирующая рибосома препятствует спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы в ходе транскрипции *in vivo* и способствует повышению эффективности преодоления белковых препятствий на матрице ДНК.
2. Предложена модель контроля транскрипции транслирующими рибосомами.
3. Получены экспериментальные данные *in vivo*, показывающие, что остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы служит мишенью для фактора Mfd.
4. Установлено, что фактор UvrD смещает элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции *in vivo*.
5. На основании экспериментальных данных построена модель координации транскрипции с репарацией ДНК.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Proshkin S., Rahmouni A.R., Mironov A., Nudler E. (2010) Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*. **328**, 504-508.
2. Прошкин С.А., Миронов А.С. (2011) Регуляция элонгации транскрипции у бактерий. *Молекулярная биология*. **45**, 395-415.
3. Epshtein V., Kamarthapu V., McGary K., Svetlov V., Ueberheide B., Proshkin S., Mironov A., and Nudler E. (2014) UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards. *Nature*. **505**, 372-377.
4. Proshkin S. Mironov A. (2013) Effects of RapA, the bacterial SWI2/SNF2 family factor, on transcription *in vivo*. *FEBS J.*, **280** (s1), p. 40 (Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013).
5. Прошкин С.А. (2013) Неравномерное течение транскрипции. *XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященная 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН. Материалы конференции. Москва, 11-15 февраля 2013 г., с. 27.*